

502-083  
Rec'd PCT/PTO 22 JUL 2004

10/502083

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT IM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. August 2003 (07.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/064638 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/00221

(22) Internationales Anmeldedatum:  
13. Januar 2003 (13.01.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 03 713.2 30. Januar 2002 (30.01.2002) DE  
102 05 607.2 11. Februar 2002 (11.02.2002) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, 67056 Ludwigshafen (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): LERCHL, Jens [DE/SE]; Onsjövägen 17, S-268 31 Svalöv (SE). HEINZ, Ernst [DE/DE]; Püttkampsweg 13, 22609 Hamburg (DE). ZANK, Thorsten [DE/DE]; Lorenzengasse 13, 22303 Hamburg (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(74) Anwalt: BIEBERBACH, Andreas; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(54) Title: NOVEL ELONGASE GENE AND METHOD FOR PRODUCING POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

(54) Bezeichnung: NEUES ELONGASEGEN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG MEHRFACH UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to a novel elongase gene comprising the sequence SEQ ID NO:1 or the homologues, derivatives or analogues thereof, to a gene construct comprising said gene or the homologues, derivatives or analogues thereof, and to the use of the same. The invention also relates to vectors or organisms having an elongase gene comprising the sequence SEQ ID NO:1 or the homologues, derivatives or analogues thereof. The invention further relates to a method for producing polyunsaturated fatty acids and to a method for introducing DNA into organisms which produce large quantities of oils, especially oils having a high unsaturated fatty acid content. Disclosed is also an oil and/or a fatty acid composition having a higher content of polyunsaturated fatty acids comprising at least two double bonds, and/or a triacylglycerine composition having a higher content of polyunsaturated fatty acids comprising at least two double bonds.

(57) Zusammenfassung: Diese Erfindung betrifft ein neues Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seine Homologa, Derivate oder Analoga, ein Genkonstrukt, das dieses Gen oder seine Homologa, Derivate oder Analoga umfasst, sowie seine Verwendung. Die Erfindung betrifft zudem Vektoren oder Organismen, die ein Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seine Homologa, Derivate oder Analoga umfassen. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren und ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Organismen, die grosse Mengen an Ölen und insbesondere Ölen mit hohem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren produzieren. Ausserdem betrifft die Erfindung ein Öl und/oder eine Fettsäure zusammensetzung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder eine Triacylglycerin-Zusammensetzung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen.

WO 03/064638 A2  
BEST AVAILABLE COPY

Neues Elongasegen und Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren

5 Beschreibung

- Diese Erfindung betrifft ein neues Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seine Homologa, Derivate oder Analoga, ein Genkonstrukt, das dieses Gen oder seine Homologa, Derivate oder Analoga umfasst, sowie seine Verwendung. Die Erfindung betrifft zudem Vektoren oder Organismen, die ein Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seine Homologa, Derivate oder Analoga umfassen.
- 10 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren und ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Organismen, die große Mengen an Ölen und insbesondere Ölen mit hohem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren produzieren. Außerdem betrifft die Erfindung ein Öl und/oder eine Fettsäure-
- 20 zusammensetzung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder eine Triacylglycerin-Zusammensetzung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen.
- 25 Bestimmte Produkte und Nebenprodukte natürlich vorkommender Stoffwechselprozesse in mikrobiellen Zellen oder in den Zellen von Tieren und vorteilhaft Pflanzen sind für ein breites Spektrum an Industrien, einschließlich der Futtermittel-, Nahrungsmittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie, nützlich. Zu diesen
- 30 gemeinsam als "Feinchemikalien" bezeichneten Molekülen gehören auch Lipide und Fettsäuren, unter denen eine beispielhafte Klasse die mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) werden beispielsweise Nahrungsmittel für Kinder zugegeben, um einen höheren
- 35 Nährwert dieser Nahrungsmittel zu erzeugen. PUFAs haben zum Beispiel einen positiven Einfluss auf den Cholesterinspiegel im Blut von Menschen und eignen sich daher zum Schutz gegen Herzkrankheiten. Feinchemikalien wie mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) lassen sich
- 40 aus tierischen Quellen, wie beispielsweise Fisch, isolieren oder mit Mikroorganismen durch Züchtung von Mikroorganismen, die so entwickelt worden sind, dass sie große Mengen eines oder mehrerer gewünschter Moleküle produzieren und akkumulieren oder sezernieren, im großen Maßstab herstellen.

Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFAs sind Mikroorganismen, wie die Algen *Phaeodactylum tricornutum* oder *Cryptothecodinium*-Arten, Ciliaten, wie *Stylonicchia* oder *Colpidium*, Pilze, wie *Mortierella*, *Entomophthora*, *Mucor*. Durch  
5 Stammselektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden Mikroorganismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen, einschließlich PUFAs, produzieren. Die Selektion von Stämmen mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges  
10 Verfahren.

Alternativ kann die Produktion von Feinchemikalien geeigneterweise über die Produktion von Pflanzen, die so entwickelt sind, dass sie die vorstehend genannten PUFAs herstellen, im großen  
15 Maßstab durchgeführt werden. Besonders gut für diesen Zweck geeignete Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblumen, Disteln, Borretsch und Nachtkerze. Aber auch andere Nutzpflanzen, die Öle oder Lipide und Fettsäuren enthalten,  
20 sind gut geeignet, wie in der eingehenden Beschreibung dieser Erfindung erwähnt. Mittels herkömmlicher Züchtung, über die Selektion geeigneter Pflanzen, ist eine Reihe von Mutantpflanzen entwickelt worden, die ein Spektrum an wünschenswerten Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen produzieren.  
25 Die Selektion neuer Pflanzensorten mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls ist jedoch ein zeitaufwändiges und schwieriges Verfahren oder sogar unmöglich, wenn die Verbindung in der entsprechenden Pflanze nicht natürlich vorkommt, wie im Fall von mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>-Fettsäuren und solchen mit  
30 längeren Kohlenstoffketten.

Aufgrund der positiven Eigenschaften ungesättigter Fettsäuren hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt  
35 sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine  $\Delta$ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine  $\Delta$ -15-Desaturase in WO 94/11516 wird eine  $\Delta$ -12-Desaturase  
40 beansprucht.  $\Delta$ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, WO 96/21022 und WO 99/27111 beschrieben. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al.,  
45 Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659 beschrieben. In WO 96/13591 wird eine  $\Delta$ -6-Palmitoyl-ACP-Desaturase beschrieben und beansprucht. Die biochemische

Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisieren sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147,

5 Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792).

In Hefen konnte sowohl eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin als auch eine Steigerung der Produktivität nachgewiesen werden (siehe Huang et al., Lipids 34, 10 1999: 649-659, Napier et al., Biochem. J., Vol. 330, 1998: 611-614). Die Expression der verschiedenen Desaturasen in transgenen Pflanzen zeigte allerdings nicht den gewünschten Erfolg. Eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin konnte gezeigt werden, gleichzeitig zeigte sich aber, 15 dass die Syntheseleistung der transgenen Pflanzen stark nachließ, das heißt gegenüber den Ausgangspflanzen konnten nur geringere Mengen an Ölen isoliert werden.

Die Klonierung und Expression von Elongasen, die ungesättigte 20 Fettsäuren als Substrat der enzymatischen Reaktion um mindestens zwei C-Atome elongieren, wurde bisher weder in Hefen noch in Pflanzen beschrieben.

Das heißt weder in Hefen noch in Kulturpflanzen werden natür- 25 licherweise mehrfach ungesättigte C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) hergestellt.

30 Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen Genen, die für Enzyme kodieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen, diese in einem technischen Maßstab herzustellen. Ein besonders hoher Bedarf besteht für Elongasen, die ungesättigte Fettsäuren um mindestens 35 zwei C-Atome elongieren. Keines der bisher bekannten biotechnologischen Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren liefert die vorgenannten Fettsäuren in wirtschaftlich nutzbaren Mengen.

40 Bei der Expression von Genen in Pflanzen gibt es immer wieder Probleme, das heißt es kommt durch die Expression nicht zur erwarteten Steigerung bei der Herstellung des gewünschten Wertprodukts.

45 Es bestand daher die Aufgabe neue Elongasegene zu identifizieren, zu klonieren und zu exprimieren und sie dadurch für die Synthese ungesättigter Fettsäuren wie mehrfach ungesättigte C<sub>20</sub>- und/oder

C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) zur Verfügung zu stellen.

- 5 Diese Aufgabe wurde durch die erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäure gelöst, die für ein Polypeptid kodiert, das C<sub>16</sub>- oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert, wobei die Fettsäuren C<sub>18:3</sub><sup>Δ5t,9,12</sup>, C<sub>20:3</sub><sup>Δ8,11,14</sup>, C<sub>20:4</sub><sup>Δ5,8,11,14</sup> und C<sub>20:5</sub><sup>Δ5,8,11,14,17</sup> nicht verlängert werden.

Vorteilhaft wird die Aufgabe durch eine isolierte Nukleinsäure gelöst, umfassend eine Nukleotidsequenz, die ein Polypeptid kodiert, das C<sub>16</sub>- oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül verlängert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus

- a) einer in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz,
- 20 b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich gemäß dem degenerierten genetischen Code von der in SEQ ID NO:2 dargestellten Sequenz ableitet,
- c) Derivate der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, die Polypeptide mit mindestens 50 % Homologie zu der Sequenz kodiert, die die Aminosäuresequenzen in SEQ ID NO:2 kodiert, wobei die Sequenz als C<sub>16</sub>- oder C<sub>18</sub>-Elongase wirkt.

Vorteilhaft verlängert die Nukleotidsequenz ausgewählt aus der vorgenannten Gruppe von C<sub>16</sub>- oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome, wobei die folgenden Fettsäuren C<sub>18:3</sub><sup>Δ5t,9,12</sup>, C<sub>20:3</sub><sup>Δ8,11,14</sup>, C<sub>20:4</sub><sup>Δ5,8,11,14</sup> und C<sub>20:5</sub><sup>Δ5,8,11,14,17</sup> jedoch nicht verlängert werden. Bevorzugt werden C<sub>16</sub>- oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit zwei, drei oder vier Doppelbindungen im Fettsäuremolekül verlängert. Während Fettsäuren wie C<sub>18:3</sub><sup>Δ5t,9,12</sup>, C<sub>20:3</sub><sup>Δ8,11,14</sup>, C<sub>20:4</sub><sup>Δ5,8,11,14</sup> und C<sub>20:5</sub><sup>Δ5,8,11,14,17</sup> nicht verlängert werden, werden Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe C<sub>18:2</sub><sup>Δ9,12</sup>, C<sub>18:3</sub><sup>Δ4,7,10</sup>, C<sub>18:3</sub><sup>Δ5,8,11</sup>, C<sub>18:3</sub><sup>Δ6,9,12</sup>, C<sub>18:3</sub><sup>Δ7,10,13</sup>, C<sub>18:3</sub><sup>Δ8,11,14</sup>, C<sub>18:3</sub><sup>Δ9,12,15</sup>, C<sub>18:4</sub><sup>Δ6,9,12,15</sup>, C<sub>18:3</sub><sup>Δ5c,9,12</sup> oder C<sub>16:3</sub><sup>Δ7,10,13</sup> elongiert. Die erfindungsgemäßen Elongasen zeigen eine Präferenz gegenüber C<sub>18:3</sub><sup>Δ6,9,12</sup>-, C<sub>18:4</sub><sup>Δ6,9,12,15</sup>- und C<sub>16:3</sub><sup>Δ7,10,13</sup>-Fettsäuren, die vorteilhaft mindestens um den Faktor 1,5, bevorzugt mindestens um den Faktor 1,6, besonders bevorzugt mindestens um den Faktor 1,7 oder ganz besonders bevorzugt mindestens um den Faktor 1,8 höher ist als gegenüber den ungesättigten Fettsäuren wie C<sub>18:2</sub><sup>Δ9,12</sup>-, C<sub>18:3</sub><sup>Δ4,7,10</sup>-, C<sub>18:3</sub><sup>Δ5,8,11</sup>-,

C<sub>18:3</sub><sup>Δ7,10,13-</sup>, C<sub>18:3</sub><sup>Δ8,11,14-</sup>, C<sub>18:3</sub><sup>Δ9,12,15-</sup> oder C<sub>18:3</sub><sup>Δ5,c9,12-</sup>-Fettsäuren.

- Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, die C<sub>16</sub>- oder
- 5 C<sub>18</sub>-Fettsäuren elongieren, stammen ursprünglich vorteilhaft aus Pilzen bevorzugt aus Pilzen wie den Oomyzeten zum Beispiel Oomyzeten wie die der Gattung *Phytophthora*, besonders bevorzugt aus Oomyzeten der Gattung und Art *Phytophthora infestans*.
- 10 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können zur Modifikation von Ölen, Fettsäuren, Lipiden, von Lipiden stammenden Verbindungen und am stärksten bevorzugt zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden.
- 15 Als Wirtsorganismen für die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eignen sich vorteilhaft Mikroorganismen, wie *Phaeodactylum*, *Colpidium*, *Mortierella*, *Entomophthora*, *Mucor*, *Cryptocodium* sowie andere Algen und Pilze und Pflanzen, insbesondere Ölfruchtpflanzen, die in der Industrie zur Produktion einer Vielzahl von
- 20 Feinchemikalien im großen Maßstab verwendet werden.

- Mit den in beispielsweise in WO 98/01572 offenbarten Klonierungsvektoren und Techniken zur genetischen Manipulation der oben-
- genannten Mikroorganismen und Ciliaten oder den in Falciatore
- 25 et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1(3):239-251, sowie Dunahay et al., 1995, *Genetic transformation of diatoms*, *J. Phycol.* 31:10004-1012 und den Zitaten darin für Algen und verwandten Organismen, wie *Phaeodactylum tricornutum* beschriebenen Methoden und Vektoren, können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle
- 30 zur gentechnologischen Veränderung dieser Organismen verwendet werden, so dass sie bessere oder effizientere Produzenten einer oder mehrerer Feinchemikalien werden. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie kann durch eine direkte Wirkung der Manipulation einer erfindungs-
- 35 gemäßen Nukleinsäure vorteilhaft in Form des gesamten Gens oder durch eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden.

- Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme,
- 40 die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) herstellen. Auch pilzliche Systeme wie Oomyzeten (Eukarioten/Stramenopiles/Oomyzeten/Pythialen/Pythiaceen) stellen die vorgenannten Fettsäuren her. Daher eignen
- 45 sich Nukleinsäuremoleküle, die einem Oomyzet wie *Phytophthora infestans* stammen, besonders zur Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere in Mikro-

organismen, wie den vorstehend erwähnten Mikroorganismen, und Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, beispielsweise Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblumen, Borretsch. Ferner können Nukleinsäuren aus einem Oomyzet wie Phytophthora infestans zur Identifikation solcher DNA-Sequenzen und Enzyme in anderen Arten, die sich zur Modifikation der Biosynthese von Vorläufermolekülen von PUFAs in den entsprechenden Organismen eignen, verwendet werden.

Der Pilz Phytophthora infestans ist ein Mitglied der Oomyzeten. Er ist mit anderen Pilzen verwandt, die in Abwesenheit von Licht wachsen kann. Pilze, wie Phytophthora, sind auf DNA-Sequenz- und Polypeptid-Ebene sehr homolog zueinander, was die Verwendung von heterologem Screening von DNA-Molekülen mit von anderen Pilzen oder Organismen stammenden Sonden ermöglicht, so dass bei vorhandenen sein weiterer Nukleinsäuresequenzen neben der erfindungsgemäßen Sequenz eine Konsensussequenz abgeleitet werden kann, die sich zum heterologen Screening oder zur funktionellen Kommentierung und Vorhersage von Genfunktionen in dritten Arten eignet. Derzeit ist eine Vorhersage der Funktion der durch die Sequenzen kodierten Proteine bzw. Enzyme jedoch noch nicht möglich. Die Fähigkeit, diese Funktionen zu identifizieren, z.B. die Vorhersage der Substratspezifität von Enzymen, kann daher von signifikanter Bedeutung sein. Ferner können diese Nukleinsäuremoleküle als Bezugssequenzen zur Kartierung anderer Pilze oder zur Ableitung von PCR-Primern dienen.

Weiterhin wurde zum ersten mal ein funktionell aktives PSE Gen aus dem Oomyzeten Phytophthora infestans isoliert (Eukarioten/Stramenopiles, Oomyceten/Phythialen/Pythiaceen). Das Gen ist vorteilhaft zur Produktion langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren geeignet, vorzugsweise mit mehr als sechzehn oder achtzehn Kohlenstoffatomen im Kohlenstoffgrundgerüst der Fettsäure und/oder mindestens zwei Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette, geeignet ist, wobei die durch die erfindungsgemäße Sequenz kodierte Enzyme eine Präferenz gegenüber den oben genannten Fettsäuren bei der Elongierung aufweisen.

Dieses neue Nukleinsäuremolekül kodiert für ein Protein, das hier als PUFA-spezifische Elongase (PSEs oder im Singular PSE bezeichnet werden). Diese PSEs können beispielsweise eine Funktion ausüben, die am Stoffwechsel (z.B. an der Biosynthese oder am Abbau) von Verbindungen, die zur Lipid- oder Fettsäuresynthese notwendig sind, wie PUFAs, beteiligt sind oder am Transmembrantransport einer oder mehrerer Lipid-/Fettsäureverbindungen entweder in die oder aus der Zelle teilnehmen.

- In dieser neuen Anmeldung wird die Funktion der Sequenz eingehender dargestellt. Wir haben zum ersten Mal ein funktionell aktives Oomyceten isoliert, das zur Produktion langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren, vorzugsweise mit mehr als sechzehn oder
- 5 achtzehn Kohlenstoffatomen im Kohlenstoffgrundgerüst der Fettsäure und/oder mindestens zwei Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette, geeignet ist, wobei die durch die erfindungsgemäßen Sequenzen kodierte Enzyme eine Präferenz gegenüber den oben genannten Fettsäuren bei der Elongierung aufweisen. Daher ist
- 10 hierin von einem PSE-Gen oder -Protein die Rede. Andere Veröffentlichungen und Patente offenbaren oder zeigen kein funktionell aktives PSE-Gen, obgleich es verschiedene bekannte Patentanmeldungen gibt, welche die Verlängerung gesättigter Fettsäuren mit kurzer oder mittlerer Kette (WO 98/46776 und US 5,475,099) oder
- 15 die Verlängerung oder Produktion langkettiger Fettsäuren, die dann aber nicht mehr als eine Doppelbindung haben oder zu langkettigen Fettsäure-Wachsestern führen (siehe: WO 98/54954, WO 96/13582, WO 95/15387) zeigen.
- 20 WO 99/64616, WO 98/46763, WO 98/46764, WO 98/46765 beschreiben zwar die Herstellung von PUFAs in transgenen Pflanzen und zeigen die Klonierung und funktionelle Expression entsprechender Desaturase-Aktivitäten, insbesondere aus Pilzen, zeigen aber kein unumgängliches PSE-kodierendes Gen und keine funktionelle PSE-
- 25 Aktivität. Die Herstellung einer Triensäure mit C<sub>18</sub>-Kohlenstoffkette ist gezeigt und anhand von gamma-Linolensäure beansprucht worden, es wurde jedoch bisher nicht die Herstellung sehr langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren (mit C<sub>20</sub>- und längerer Kohlenstoffkette sowie von Triensäuren und höher ungesättigten
- 30 Typen) und die Substratspezifität der Elongase gelehrt.

- Zur Herstellung langkettiger PUFAs müssen die mehrfach ungesättigten C<sub>16</sub>- und/oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren durch die enzymatische Aktivität einer Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome ver-
- 35 längert werden. Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodiert die erste pilzliche Elongase, die C<sub>16</sub>- und/oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängern kann. Nach einer Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C<sub>20</sub>-Fettsäuren, und nach zwei,
- 40 drei und vier Elongationsrunden zu C<sub>22</sub>-, C<sub>24</sub>- oder C<sub>26</sub>-Fettsäuren. Von Vorteil bei der erfindungsgemäßen enzymatischen Aktivität ist, dass nicht alle ungesättigten C<sub>20</sub>-Fettsäuren verlängert werden. Dies ermöglicht die spezifische Synthese einzelner wünschenswerter ungesättigter Fettsäuren bzw. Fettsäuregemische.
- 45 Mit der erfindungsgemäßen Elongase können auch längere PUFAs synthetisiert werden. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Elongasen führt vorzugsweise zu C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens



zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei oder vier Doppelbindungen, besonders bevorzugt sind Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta 6$  Position. Nachdem die Verlängerung mit den erfindungsgemäßen Enzymen stattgefunden hat, können weitere Desaturierungsschritte erfolgen. Daher führen die Produkte der Elongaseaktivität und der möglichen weiteren Desaturierung zu bevorzugten PUFAs mit einem höheren Desaturierungsgrad, wie Docosadiensäure, Arachidonsäure,  $\omega 6$ -Eicosatriendihomo- $\gamma$ -linolensäure, Eicosapentensäure,  $\omega 3$ -Eicosatriensäure,  $\omega 3$ -Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure. Substrate der erfindungsgemäßen Enzymaktivität sind zum Beispiel Taxolsäure; 6,9-Octadecadiensäure, Linolsäure,  $\gamma$ -Linolensäure, Pinolensäure,  $\alpha$ -Linolensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure,  $\gamma$ -Linolensäure und/oder  $\alpha$ -Linolensäure. Die  $C_{16}$ - und/oder  $C_{18}$ -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

Unter der Verwendung von Klonierungsvektoren, die zur Verwendung in Pflanzen und zur Pflanzentransformation geeignet sind, wie denjenigen, die in Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225)) und den in diesen Schriften genannten Zitaten veröffentlicht worden sind, lassen sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Pflanzen verwenden, so dass diese ein besserer oder effizienterer Produzent eines oder mehrerer von Lipiden hergeleiteter Produkte, wie PUFAs, wird. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion eines von Lipiden hergeleiteten Produktes, wie PUFAs, kann durch direkte Wirkung der Manipulation oder eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung eines erfindungsgemäßen PSE-Proteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einer Ölfruchtpflanze oder einem Mikroorganismus aufgrund eines veränderten Proteins direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder

Aktivität des PSE-Proteins, -nukleinsäure und/oder -Gens kann erhöht sein, so dass größere Mengen dieser Verbindungen de novo hergestellt werden, weil den Organismen diese Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese vor dem Einbringen der entsprechenden Nukleinsäure und/oder des entsprechenden Gens fehlte.

Das Einbringen einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder eines PSE-Gens in einen Organismus oder eine Zelle kann nicht nur den Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöhen, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöhen oder de novo schaffen. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Feinchemikalien (z.B. Fettsäuren, polaren und neutralen Lipiden) nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFAs, wie im folgenden beschrieben, weiter gesteigert wird. Fettsäuren und Lipide sind selbst als Feinchemikalien wünschenswert; durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer oder mehrerer PSEs, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer PSEs, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Pflanzen oder Mikroorganismen zu steigern.

Die Mutagenese des erfindungsgemäßen PSE-Gens bzw. der Nukleinsäure kann auch zu einem PSE-Protein mit geänderten Aktivitäten führen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien direkt oder indirekt beeinflussen. Beispielsweise kann die Anzahl oder Aktivität des erfindungsgemäßen PSE-Gens bzw. der Nukleinsäure gesteigert werden, so dass die normalen Stoffwechselabfälle oder -nebenprodukte der Zelle (deren Menge möglicherweise aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie erhöht ist) effizient exportiert werden, bevor sie andere Moleküle oder Prozesse innerhalb der Zelle (welche die Lebensfähigkeit der Zelle senken würden) zerstören oder die Biosynthesewege der Feinchemikalie stören würden (wodurch die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion der gewünschten Feinchemikalie verringert wird). Ferner können die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie selbst toxisch für die Zelle sein oder Enzym-Rückkopplungsmechanismen, wie die allosterische Regulation, stören, beispielsweise könnte sie durch Steigerung der Aktivität oder Anzahl anderer stromabwärts folgender Enzyme oder Entgiftungsenzyme des PUFA-Wegs die Allokation der PUFA in die Triacyl-

## 10

- gylcerin-Fraktion steigern, man könnte die Lebensfähigkeit von Saatzellen erhöhen, was wiederum zu besserer Entwicklung von Zellen in Kultur oder zu Saaten führt, die die gewünschte Feinchemikalie produzieren. Die erfindungsgemäßen PSE-Gene bzw.
- 5 Nukleinsäuren können auch so manipuliert werden, dass die entsprechenden Mengen der verschiedenen Lipid- und Fettsäuremoleküle hergestellt werden. Dies kann eine einschneidende Wirkung auf die Lipidzusammensetzung der Membran der Zelle haben und erzeugt neue Öle zusätzlich zum Auftreten neusynthetisierter PUFAs. Da jeder
- 10 Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität erheblich verändern. Änderungen der Membranfluidität können sich auf den Transport von Molekülen über die Membran sowie auf die Unversehrtheit der Zelle auswirken, die
- 15 beide eine entscheidende Wirkung auf die Produktion von Feinchemikalien besitzen. In Pflanzen können diese Änderungen überdies auch andere Merkmale, wie Toleranz gegenüber abiotischen und biotischen Stresssituationen, beeinflussen.
- 20 Biotische und abiotische Stresstoleranz ist ein allgemeines Merkmal, das man an ein breites Spektrum von Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Distel, Baumwolle, Raps und Canola, Maniok, Pfeffer, Sonnenblume und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel,
- 25 Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte, vererben möchte. Diese Feldfrüchte sind als weitere erfindungsgemäße Ausführungsform auch bevorzugte Zielpflanzen für die Gentechnologie.
- 30 Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Sojabohne, Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Diestel, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Alfalfa, oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee).
- 35 Folglich betrifft ein Aspekt der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle (z.B. cDNAs), umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine PSE oder biologisch aktive Teile davon kodiert, oder Nukleinsäurefragmente, die sich als Primer oder Hybridisierungs-
- 40 sonden zum Nachweis oder zur Amplifikation PSE-kodierender Nukleinsäuren (z.B. DNA oder mRNA) eignen. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Nukleinsäuremolekül eine der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleotidsequenzen oder die kodierende Region oder ein Komplement einer dieser Nukleotid-
- 45 sequenzen. Bei anderen besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine Nukleotidsequenz, wie in

## 11

der Sequenz SEQ ID NO:1 dargestellt, oder einen Teil davon hybridisiert oder zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 5 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog dazu ist, wobei unter Homologie im Sinne der Erfindung Identität zu verstehen ist. Bei anderen bevorzugten Ausführungsformen kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül eine der in der Sequenz SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenzen. Das bevorzugte erfindungsgemäße 10 PSE-Gen bzw. die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz besitzt vorzugsweise auch mindestens eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten.

Bei einer weiteren Ausführungsform kodiert das isolierte 15 Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Teil davon, wobei das Protein oder der Teil davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO:2 ist, dass das Protein oder der Teil davon eine PSE-Aktivität beibehält, wobei unter Homologie im Sinne der Erfindung 20 Identität zu verstehen ist. Vorzugsweise behält das Protein oder der Teil davon, das/der von dem Nukleinsäuremolekül kodiert wird, die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen von Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen. Bei einer Ausführungs- 25 form ist das von dem Nukleinsäuremolekül kodierte Protein zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO:2. Bei 30 einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Protein ein Vollängen- Phytophthora infestans-Protein, das im wesentlichen homolog zu einer gesamten Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 (die von dem in SEQ ID NO:1 gezeigten offenen Leserahmen her rührt) ist.

35 Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform rührt das isolierte Nukleinsäuremolekül von Phytophthora infestans her und kodiert ein Protein (z.B. ein PSE-Fusionsprotein), das eine biologisch aktive Domäne enthält, die zu mindestens etwa 50 % oder mehr 40 homolog (identisch) zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO:2 ist und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von Pilzen zum Aufbau von ungesättigten Fettsäuren notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über Membranen teilzunehmen, beibehält oder zumindest eine der in der Tabelle I aufgeführten Aktivitäten 45 besitzt, und umfasst auch heterologe Nukleinsäuresequenzen, die ein heterologes Polypeptid oder regulatorische Proteine kodieren.

## 12

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren codieren für Proteine, die Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe  $C_{18:2}^{\Delta 9,12}$ ,  $C_{18:3}^{\Delta 4,7,10}$ ,  $C_{18:3}^{\Delta 5,8,11}$ ,  $C_{18:3}^{\Delta 6,9,12}$ ,  $C_{18:3}^{\Delta 7,10,13}$ ,  $C_{18:3}^{\Delta 8,11,14}$ ,  $C_{18:3}^{\Delta 9,12,15}$ ,  $C_{18:4}^{\Delta 6,9,12,15}$ ,  $C_{18:3}^{\Delta 5c,9,12}$  oder  $C_{16:3}^{\Delta 7,10,13}$  elongieren, während 5 Fettsäuren wie  $C_{18:3}^{\Delta 5t,9,12}$ ,  $C_{20:3}^{\Delta 8,11,14}$ ,  $C_{20:4}^{\Delta 5,8,11,14}$  und  $C_{20:5}^{\Delta 5,8,11,14,17}$  nicht verlängert werden. Das PSE Gen wurde heterolog in Hefe exprimiert und verschiedene mehrfach(poly)-ungesättigte Fettsäuren wurden einzeln gefüttert und von dem transformierten Hefen umgesetzt. Analysiert wurden Fettsäureprofile von transgenen 10 Hefen mittels GLC. Der Prozentsatz von umgesetzten gefütterten Fettsäuren wurde folgendermaßen berechnet:  $\text{mol\%} \frac{(\text{Produkt}) \times 100}{[\text{mol\%}(\text{Edukt}) + \text{mol\%}(\text{Produkt})]}$ .

Tabelle I gibt Fettsäuren wieder, die durch das erfindungsgemäße 15 Enzym elongiert werden.

20

25

30

35

40

45

Tabelle I: Fettsäuren (in mol%) von Hefezellen transformiert mit dem Plasmid pYES2 (Kontrolle) und pY2piPSE1. Gefüttert wurden 18:2,  $\gamma$ -18:3,  $\alpha$ -18:3 oder 18:4 Fettsäuren. Die gesamte Lipidfraktion wurde transmethyliert und das Fettsäureprofil mittels GC bestimmt. Berechnung %-Elongation:  $100 \times \text{mol\% (Produkt)} / [\text{mol\% (Edukt)} + \text{mol\% (Produkt)}]$ . Substrate und elongierte Fettsäuren werden im Fettdruck wiedergegeben.

	% of total fatty acids										
	pYES2					PY2piPSE1					
	+18:2	+ $\gamma$ -18:3	+ $\alpha$ -18:3	+18:4		+18:2	+ $\gamma$ -18:3	+ $\alpha$ -18:3	+18:4		
Fatty acids	13.7	16.4	14.3	19.5		9.8	9.8	7.3	10.6		
16:0	8.8	6.5	3.4	7.8		9.9	4.1	1.3	2.3		
16:1 <sup>49</sup>	6.9	9.9	11.3	13.3		8.6	12.3	14.4	19.4		
18:0	9.9	10.5	6.0	13.6		15.3	11.8	5.6	8.4		
18:1 <sup>49</sup>	60.7	-	-	-		41.0	-	-	-		
18:2 <sup>49,12</sup>	-	56.7	-	-		-	51.1	-	-		
18:3 <sup>46,9,12</sup>	-	-	64.7	-		-	-	65.1	-		
18:4 <sup>6,9,12,15</sup>	-	-	-	45.7		-	-	-	48.3		
20:2 <sup>11,14</sup>	-	-	-	-		2.1	-	-	-		
20:3 <sup>48,11,14</sup>	-	-	-	-		-	11.0	-	-		
20:3 <sup>41,14,17</sup>	-	-	-	-		-	-	6.2	-		
20:4 <sup>8,11,14,17</sup>	-	-	-	-		-	-	-	11.0		
%elongation	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		4.9	17.7	8.7	18.5		

Bei einer anderen Ausführungsform ist das isolierte Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen an ein Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 umfasst. Vorzugsweise entspricht das isolierte Nukleinsäuremolekül einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Stärker bevorzugt kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül natürlich vorkommende *Phytophthora infestans*-PSE oder einen biologisch aktiven Teil davon.

10

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, z.B. rekombinante Expressionsvektoren, die mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten, und Wirtszellen, in die diese Vektoren eingebracht worden sind, insbesondere Mikroorganismen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe, -organe oder ganze Pflanzen. Auch nicht humane tierische Wirtszellen wie beispielsweise *Caenorhabditis elegans* können vorteilhaft verwendet werden. Bei einer Ausführungsform kann eine solche Wirtszelle Feinchemikalien-Verbindungen, insbesondere PUFAs, speichern; zur Isolation der gewünschten Verbindung werden die Zellen geerntet. Die Verbindung (Öle, Lipide, Triacylglyceride, Fettsäuren) oder die PSE können dann aus dem Medium oder der Wirtszelle, welche bei Pflanzen Zellen sind, die Feinchemikalien enthalten oder speichern, am stärksten bevorzugt Zellen von Speichergeweben, wie Samenhüllen, Knollen, Epidermis- und Samenzellen, isoliert werden.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine genetisch veränderte Pflanze (= transgene Pflanze), bevorzugt ein Ölfrucht-  
pflanze, wie vorstehend erwähnt oder einen genetisch veränderte Pilz (= transgener Pilz), besonders bevorzugt einen Pilz aus der Gattung *Phytophthora* oder eine Pflanze, in die ein PSE-Gen bevorzugt aus einem Oomyceten wie vorteilhaft *Phytophthora infestans* eingebracht worden ist oder in der ein PSE-Gen verändert worden ist. Bei einer Ausführungsform ist das Genom von *Phytophthora infestans* durch Einbringen eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, das eine Wildtyp- oder mutierte PSE-Sequenz kodiert, als Transgen verändert worden. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein endogenes PSE-Gen im Genom des Oomyceten *Phytophthora infestans* durch homologe Rekombination mit einem veränderten PSE-Gen verändert, d.h. funktionell zerstört, worden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform gehört der Pflanzenorganismus zur Gattung *Physcomitrella*, *Ceratodon* oder *Funaria*, wobei *Physcomitrella* besonders bevorzugt ist. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird die *Physcomitrella*-Pflanze auch zur Produktion einer gewünschten Verbindung, wie Lipiden und Fettsäuren, wobei PUFAs besonders bevorzugt sind, verwendet.

## 15

Bei noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann der Oomyzet *Phytophthora* zur Demonstration der Funktion eines Moosgens unter Verwendung homologer Rekombination auf der Basis der in dieser Erfindung beschriebenen Nukleinsäuren verwendet werden.

5

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäuresequenz, ein PSE-Gen oder einen Teil, z.B. einen biologisch aktiven Teil, davon. Bei einer bevorzugten Ausführungsform kann die isolierte Nukleinsäuresequenz,

- 10 die PSE oder ein Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in einem Mikroorganismus oder einer Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über dessen/deren Membranen teilnehmen. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die isolierte Nukleinsäuresequenz, die PSE
- 15 oder der Teil davon ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, dass dieses Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzenzellen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält.
- 20

Die Erfindung stellt auch eine isolierte Präparation einer PSE (PSE-Protein) bereit. Bei bevorzugten Ausführungsformen umfasst die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bzw. das PSE-Gen eine

25 Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein isoliertes Volllängenprotein, das im wesentlichen homolog zu einer gesamten Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 (die von dem in SEQ ID NO:1 gezeigten offenen Leserahmen kodiert wird) ist. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Protein zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog (= identisch) zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO:2. Bei anderen Aus-

30 führungsformen umfasst die isolierte Nukleinsäuresequenz bzw. PSE eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens etwa 50 % homolog zu einer der Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO:2 ist und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren in einem Mikroorganismus oder einer Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder eine

40 oder mehrere der PUFA-verlängernden Aktivitäten hat, wobei die Verlängerung von desaturierten C<sub>16</sub>- und/oder C<sub>18</sub>-Kohlenstoffketten mit Doppelbindungen an mindestens zwei Stellen gemeint ist.

- 45 Alternativ kann das isolierte PSE-Protein eine Aminosäuresequenz umfassen, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 hybridisiert, z.B. unter



stringenten Bedingungen hybridisiert, oder zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog dazu ist. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die bevorzugten PSE-Formen ebenfalls eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten besitzen.

Das PSE-Polypeptid oder ein biologisch aktiver Teil davon kann funktionsfähig mit einem nicht-PSE-Polypeptid verbunden werden, so dass ein Fusionsprotein gebildet wird. Bei bevorzugten Ausführungsformen hat dieses Fusionsprotein eine Aktivität, die sich von derjenigen der PSE allein unterscheidet. Bei anderen bevorzugten Ausführungsform nimmt dieses Fusionsprotein am Stoffwechsel von Verbindungen, die vorteilhaft zur Synthese von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teil. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen moduliert das Einbringen dieses Fusionsproteins in eine Wirtszelle die Produktion einer gewünschten Verbindung wie vorteilhaft der Synthese von PUFAS durch die Zelle. Bei einer bevorzugten Ausführungsform enthalten diese Fusionsproteine auch  $\Delta$ -4-,  $\Delta$ -5- oder  $\Delta$ -6-Desaturase-Aktivitäten allein oder in Kombination.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie vorteilhaft von ungesättigten Fettsäuren und/oder Lipiden, die ungesättigte Fettsäuren enthalten. Dieses Verfahren beinhaltet entweder die Züchtung eines geeigneten Mikroorganismus oder die Züchtung von Pflanzenzellen, -geweben, -organen oder ganzen Pflanzen, umfassend die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 oder ihre Homologa, Derivate oder Analoga oder ein Genkonstrukt, das die SEQ ID NO: 1 oder ihre Homologa, Derivate oder Analoga umfasst, oder einen Vektor, der diese Sequenz oder das Genkonstrukt umfasst, welches die Expression eines erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremoleküls herbeiführt, so dass eine Feinchemikalie produziert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt Gewinnen einer Zelle, die eine solche erfindungsgemäße Elongase-Nukleinsäuresequenz enthält, wobei eine Zelle mit einer Elongase-Nukleinsäuresequenz, einem Genkonstrukt oder einem Vektor, welche die Expression einer erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäure herbeiführen, transformiert wird. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt Gewinnen der Feinchemikalie aus der Kultur. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform gehört die Zelle zur Ordnung der Ciliaten, zu Mikroorganismen, wie Pilzen, oder zum Pflanzenreich, insbesondere zu Ölfrucht-

pflanzen, besonders bevorzugt sind Mikroorganismen oder Ölfruchtpflanzen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Produktion eines Moleküls durch einen Mikroorganismus. Diese Verfahren umfassen das Zusammenbringen der Zelle mit einer Substanz, welche die PSE-Aktivität oder die PSE-Nukleinsäure-expression moduliert, so dass eine zellassoziierte Aktivität relativ zu der gleichen Aktivität in Abwesenheit der Substanz verändert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird/werden ein oder zwei Stoffwechselweg (e) der Zelle für Lipide und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzyme moduliert oder der Transport von Verbindungen über diese Membranen moduliert, so dass die Ausbeute oder die Rate der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch diesen Mikroorganismus verbessert ist. Die Substanz, welche die PSE-Aktivität moduliert, kann eine Substanz sein, welche die PSE-Aktivität oder PSE-Nukleinsäureexpression stimuliert oder die als Zwischenprodukt bei der Fettsäurebiosynthese verwendet werden kann. Beispiele für Substanzen, welche die PSE-Aktivität oder PSE-Nukleinsäureexpression stimulieren, sind u.a. kleine Moleküle, aktive PSEs sowie PSEs-kodierende Nukleinsäuren, die in die Zelle eingebracht worden sind. Beispiele für Substanzen, welche die PSE-Aktivität oder -Expression hemmen, sind u.a. kleine Moleküle und Antisense-PSE-Nukleinsäuremoleküle.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Ausbeuten einer gewünschten Verbindung aus einer Zelle, umfassend das Einbringen eines Wildtyp- oder Mutanten-PSE-Gens bzw. einer erfindungsgemäßen Wildtyp- oder Mutanten-Nukleinsäure, das entweder auf einem separaten Plasmid gehalten oder in das Genom der Wirtszelle integriert wird, in eine Zelle. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass die native Nukleinsäuresequenz oder das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funktionellen Expressionseinheit, welche mindestens eine die Expression eines Gens erleichternde Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens oder der Nukleinsäuresequenz erleichternde Sequenz enthält, funktionell verbunden ist.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind die Ausbeuten modifiziert. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die gewünschte Chemikalie vermehrt, wobei unerwünschte störende Verbindungen vermindert werden können. Bei einer besonders bevor-

## 18

zugten Ausführungsform ist die gewünschte Feinchemikalie ein Lipid oder eine Fettsäure, ein Cofaktor oder ein Enzym. Bei besonders bevorzugten Ausführungsform ist diese Chemikalie eine mehrfach ungesättigte Fettsäure. Stärker bevorzugt ist sie ausgewählt aus Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (AEP) oder Docosahexaensäure (DHA).

## Eingehende Beschreibung der Erfindung

- 10 Die vorliegende Erfindung stellt eine PSE-Nukleinsäure und ein Proteinmolekül bereit, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen in dem Oomycet *Phytophthora infestans* oder am Transport lipophiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind. Die erfindungsgemäßen Verbindungen
- 15 lassen sich zur Modulation der Produktion von Feinchemikalien aus Organismen, beispielsweise Mikroorganismen, wie Ciliaten, Pilzen, Hefen, Bakterien, Algen, und/oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Diestel, Brassica-Arten, wie Raps, Diestel, Canola und
- 20 Rübsen, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Maniok, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z.B.
- 25 wenn die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluss auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwenden oder können eine indirekt Auswirkung haben, die dennoch zu einer Steigerung der Ausbeute,
- 30 Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung oder einer Abnahme unerwünschter Verbindungen führt (z.B. wenn die Modulation des Stoffwechsels von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammen-
- 35 setzung der gewünschten Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien beeinflussen kann). Aspekte der Erfindung sind nachstehend weiter erläutert.

## 40 I. Feinchemikalien und PUFAs

Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und umfasst Moleküle, die durch einen Organismus produziert worden sind und Anwendungen in verschiedenen Industrien finden, wie,

45 aber nicht beschränkt auf, die pharmazeutische, Landwirtschafts-, Nahrungsmittel- und Kosmetik-Industrie. Diese Verbindungen umfassen Lipide, Fettsäuren, Cofaktoren und Enzyme usw. (wie z.B.

- beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsgb., VCH: Weinheim und darin enthaltenen Literaturstellen), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, Vitamins, S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und darin enthaltenen Literaturstellen; und Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) Nutrition, Lipids, Health and Disease Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086, und darin angegebenen Literaturstellen beschriebenen Chemikalien. Der Stoffwechsel und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

Die Kombination verschiedener Vorläufermoleküle und Biosyntheseenzyme führt zur Herstellung verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine entscheidende Auswirkung auf die Zusammensetzung der Membran hat. Es kann angenommen werden, dass PUFAs nicht nur einfach in Triacylglycerin, sondern auch in Membranlipide eingebaut werden.

Die Synthese von Membranen ist ein gut charakterisierter Prozess, an dem eine Anzahl von Komponenten, einschließlich Lipiden als Teil der Bilayer-Membran, beteiligt sind. Die Produktion neuer Fettsäuren, wie PUFAs, kann daher neue Eigenschaften von Membranfunktionen innerhalb einer Zelle oder eines Organismus erzeugen.

- Zellmembranen dienen einer Vielzahl von Funktionen in einer Zelle. Zuerst und in erster Linie grenzt eine Membran den Inhalt einer Zelle von der Umgebung ab, wodurch sie der Zelle Integrität verleiht. Membranen können auch als Schranken gegenüber dem Einstrom gefährlicher oder unerwünschter Verbindungen und auch gegenüber dem Ausstrom gewünschter Verbindungen dienen.

- Detailliertere Beschreibungen und Beteiligungen von Membranen und die beteiligten Mechanismen siehe in: Bamberg, E., et al. (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes, Q. Rev. Biophys. 26:1-25; Gennis, R.B. (1989) Pores, Channels and Transporters, in: Biomembranes, Molecular Structure and Function, Springer: Heidelberg, S. 270-322; und Nikaido, H., und Saier, H. (1992) Transport proteins in bacteria: common themes in their design, Science 258:936-942, und den in jeder dieser Literaturstellen enthaltenen Zitaten.

## 20

Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden, 5 umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA entweder in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle 10 zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F.C. Neidhardt et al. (1996) E. coli und Salmonella. ASM Press: Washington, D.C., S. 612-636 und darin enthaltene Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsgb.) (1999) Biology of 20 Procaryotes. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) Microbiological Reviews 57:522-542 und die enthaltene Literaturstellen).

Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise 25 Palmitoleinsäure, Linol- und Linolensäure. Diese C<sub>16</sub>- und/oder C<sub>18</sub>-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C<sub>20</sub> und C<sub>22</sub> verlängert werden, damit Fettsäuren vom Eicosa- und Docosa-Kettentyp erhalten werden. Dieses Elongieren erfolgt vorteilhaft mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren bzw. mit den durch diese 30 Nukleinsäuren kodierten Proteine. Mit Hilfe verschiedener Desaturasen, wie Enzymen, welche Δ-6-Desaturase-, Δ-5- und Δ-4-Desaturaseaktivität aufweisen, können Arachidonsäure, Eicosa-pentensäure und Docosahexaensäure sowie verschiedene andere langkettige PUFAs erhalten, extrahiert und für verschiedene Zwecke 35 bei Nahrungsmittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden.

Zur Herstellung langkettiger PUFAs müssen, wie oben erwähnt, die mehrfach ungesättigten C<sub>16</sub>- und/oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren um mindestens 40 zwei Kohlenstoffatome durch die Enzymaktivität einer Elongase verlängert werden. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen kodieren erste Pflanzen-Elongasen, die C<sub>16</sub>- und/oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängern können. Nach einer 45 Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C<sub>18</sub>- bzw. C<sub>20</sub>-Fettsäuren, und nach zwei, drei und vier bzw. fünf Elongationsrunden zu C<sub>22</sub>-, C<sub>24</sub>- oder C<sub>26</sub>-Fettsäuren. Mit den erfindungsgemäßen

## 21

Elongasen können auch längere PUFAs synthetisiert werden. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Elongasen führt vorzugsweise zu C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei oder vier Doppelbindungen, besonders bevorzugt drei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül. Nach der Elongation mit den erfindungsgemäßen Enzymen können weitere Desaturierungsschritte erfolgen. Daher führen die Produkte der Elongaseaktivität und der möglichen weiteren Desaturierung zu bevorzugten PUFAs mit höherem Desaturierungsgrad, wie Docosadiensäure, Arachidonsäure, ω<sub>6</sub>-Eicosatriendi-homo-γ-linolensäure, Eicosapentensäure, ω<sub>3</sub>-Eicosatriensäure, ω<sub>3</sub>-Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure. Substrate dieser erfindungsgemäßen Enzymaktivität sind zum Beispiel Taxolsäure, 6,9-Octadecadiensäure, Linolsäure, γ-Linolensäure, Pinolensäure, α-Linolensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, γ-Linolensäure und/oder α-Linolensäure. Die C<sub>16</sub>- und/oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße Enzymaktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glykolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationen transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, Lipid, 100(4-5):161-166).

Weiterhin ändert sich durch die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in den verschiedenen Wirtsorganismen nicht nur die Zusammensetzung der Membranlipide insgesamt, sondern es verändert sich die Zusammensetzung aller Verbindungen in der Wirtszelle, die ungesättigte Fettsäuren enthalten, gegenüber den ursprünglichen Wirtszellen, die die Nukleinsäuren nicht oder nicht in diesen Mengen enthalten. Diese Veränderungen sind bei Wirtsorganismen beispielsweise Pflanzenzellen ausgeprägter, die die durch die Nukleinsäuren kodierte Proteine bzw. Enzyme natürlicherweise nicht enthalten. Durch die Expression der Nukleinsäuren entstehen dadurch neue Lipidzusammensetzungen, die ein weiterer Aspekt der Erfindung sind.

Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation, Fettsäure-

## 22

modifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und -Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe in den folgenden Artikeln: Kinney, 1997, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und Browse, 1995, Plant Cell 7:957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:611-641; Voelker, 1996, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256:181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, Hrsgb.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13(1):1-16.

15

Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika, wie PUFAs, umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und somit aufnehmen müssen oder die höheren Tiere nicht mehr ausreichend selbst herstellen können und somit zusätzlich aufnehmen müssen, obwohl sie leicht von anderen Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die sie produzieren können, wie in Bakterien, ist im großen und ganzen charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996; Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research Asia, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

Die oben erwähnten Moleküle sind entweder selbst biologisch aktive Moleküle oder Vorstufen biologisch aktiver Substanzen, die entweder als Elektronenüberträger oder Zwischenprodukte bei einer Vielzahl von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungshilfsmittel. (Einen Überblick über Struktur, Aktivität und industrielle Anwendungen dieser Verbindungen siehe z.B. in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren haben verschiedene Funktionen und gesundheitsfördernde Wirkungen, beispielsweise bei koronarer Herzerkrankung, Entzündungsmechanismen, Kinderernährung usw. Veröffentlichungen und Literaturstellen, einschließlich darin zitierter Literatur-

## 23

stellen, siehe in: Simopoulos, 1999, Am. J. Clin. Nutr. 70 (3. Suppl.):560-569, Takahata et al., Biosc. Biotechnol. Biochem. 1998, 62(11):2079-2085, Willich und Winther, 1995, Deutsche Medizinische Wochenschrift 120(7):229ff. Sie sind außerdem  
5 wichtige Ausgangsstoffe für die Synthese von Verbindungen, die wichtige biologische Vorgänge innerhalb des Organismus steuern. Sie finden deshalb beispielsweise in verschiedenen diätischen Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

## 10 II. Elemente und Verfahren der Erfindung

Die vorliegende Erfindung beruht zumindest teilweise auf der Entdeckung eines neuen Moleküls, das hier als PSE-Nukleinsäure- und -Proteinmoleküle bezeichnet wird, welche eine Wirkung auf  
15 die Produktion von Zellmembranen oder Fettsäuren wie in *Physcomitrella patens*, *Ceratodon purpureus* und/oder *Phytophthora infestans* ausüben und beispielsweise die Bewegung von Molekülen über diese Membranen beeinflussen. Bei einer Ausführungsform nehmen die PSE-Moleküle am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zell-  
20 membran und/oder Fettsäuren in Organismen, wie Mikroorganismen und Pflanzen, notwendigen Verbindungen teil oder beeinflussen indirekt den Transport von Molekülen über diese Membranen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform hat die Aktivität der erfindungsgemäßen PSE-Moleküle zur Regulation der Produktion von  
25 Membrankomponenten und des Membrantransports eine Auswirkung auf die Produktion der gewünschten Feinchemikalie durch diesen Organismus. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Aktivität der erfindungsgemäßen PSE-Moleküle moduliert, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion  
30 der Stoffwechselwege von Mikroorganismen oder Pflanzen, welche die erfindungsgemäßen PSEs regulieren, moduliert sind und die Effizienz des Transport von Verbindungen durch die Membranen verändert ist, was entweder direkt oder indirekt die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten  
35 Feinchemikalie durch Mikroorganismen und Pflanzen moduliert.

Der Begriff PSE oder PSE-Polypeptid umfasst Proteine, die am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Organismen, wie Mikroorganismen und Pflanzen, notwendigen Verbindungen oder  
40 am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen. Beispiele für PSEs sind in der SEQ ID NO:1 oder ihren Homologa, Derivaten oder Analoga offenbart. Die Begriffe PSE oder PSE-Nukleinsäuresequenz(en) umfassen Nukleinsäuresequenzen, die eine PSE kodieren und bei denen ein Teil eine kodierende Region  
45 und ebenfalls entsprechende 5'- und 3'-untranslatierte Sequenzbereiche ist. Beispiele für PSE-Gene sind die in SEQ ID NO:1 dargestellten. Die Begriffe Produktion oder Produktivität sind



im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes (zum Beispiel der gewünschten Feinchemikalie), das in einer bestimmten Zeitspanne und einem bestimmten Fermentationsvolumen gebildet wird (z.B. kg Produkt 5 pro Stunde pro Liter). Der Begriff Effizienz der Produktion umfasst die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (z.B. wie lange die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff Ausbeute oder Produkt/Kohlenstoff-Ausbeute ist im Fach- 10 gebiet bekannt und umfasst die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Erhöhen der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle oder 15 der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe Biosynthese oder Biosyntheseweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischen- 20 verbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und/oder stark regulierten Prozess. Die Begriffe Abbau oder Abbauweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger 25 komplexe Moleküle) beispielsweise in einem Mehrschritt- und/oder stark regulierten Prozess. Der Begriff Stoffwechsel ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer bestimmten Verbindung (z.B. der Stoffwechsel 30 einer Fettsäure) umfasst dann die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle, die diese Verbindung betreffen.

Bei einer anderen Ausführungsform können die erfindungsgemäßen 35 PSE-Moleküle die Produktion eines gewünschten Moleküls, wie einer Feinchemikalie, in einem Mikroorganismus oder in Pflanzen modulieren. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung einer erfindungsgemäßen PSR die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus 40 einem Mikroorganismus- oder Pflanzenstamm, die dieses veränderte Protein enthalten, direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder Aktivität von PSEs, die am Transport von Feinchemikalienmolekülen innerhalb oder aus der Zelle beteiligt sind, kann erhöht werden, so dass größere Mengen dieser Verbindungen über Membranen trans- 45 portiert werden, aus denen sie leichter gewonnen und ineinander umgewandelt werden. Ferner sind Fettsäuren, Triacylglycerine und/oder Lipide selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch

## 25

- Optimierung der Aktivität oder Steigern der Anzahl einer oder mehrerer erfindungsgemäßer PSEs, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Stören der Aktivität einer oder mehrerer PSEs, die am Abbau dieser Verbindungen
- 5 beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Organismen, wie Mikroorganismen oder Pflanzen, zu erhöhen.
- 10 Die Mutagenese der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren bzw. PSE-Gene kann auch PSEs mit veränderten Aktivitäten hervorbringen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien aus Mikroorganismen oder Pflanzen indirekt beeinflussen. Beispielsweise können erfindungsgemäße PSEs, die am Export von
- 15 Abfallprodukten beteiligt sind, eine größere Anzahl oder höhere Aktivität aufweisen, so dass die normalen Stoffwechselabfälle der Zelle (deren Menge möglicherweise aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie erhöht ist) effizient exportiert werden, bevor sie die Moleküle in der Zelle schädigen können (was
- 20 die Lebensfähigkeit der Zelle herabsetzen würde) oder die Feinchemikalien-Biosynthesewege stören können (was die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie senken würde). Die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie selbst können ferner für
- 25 die Zelle toxisch sein, so dass man durch Steigern der Aktivität oder Anzahl von Transportern, die diese Verbindungen aus der Zelle exportieren können, die Lebensfähigkeit der Zelle in Kultur steigern kann, was wiederum zu einer größeren Anzahl an Zellen in der Kultur führt, welche die gewünschte Feinchemikalie produ-
- 30 zieren. Die erfindungsgemäßen PSEs können auch so manipuliert werden, dass die entsprechenden Mengen unterschiedlicher Lipid- und Fettsäuremoleküle produziert werden. Dies kann eine erhebliche Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigen-
- 35 schaften aufweist, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran sowie die Integrität der Zelle beeinflussen, was jeweils eine erhebliche Auswirkung auf die
- 40 Produktion von Feinchemikalien aus Mikroorganismen und Pflanzen in Fermentationskultur im großen Maßstab hat. Pflanzenmembranen verleihen spezifische Eigenschaften, wie Toleranz gegenüber Wärme, Kälte, Salz, Trockenheit sowie Toleranz gegen Pathogene, wie Bakterien und Pilze. Daher kann die Modulation der Membran-
- 45 komponenten eine grundlegende Wirkung auf die Überlebensfähigkeit der Pflanzen unter den oben genannten Stressparametern haben. Dies kann über Änderungen in Signalkaskaden oder direkt über die

veränderte Membranzusammensetzung erfolgen (siehe zum Beispiel: Chapman, 1998, Trends in Plant Science, 3(11):419-426) und Signalkaskaden (siehe Wang 1999, Plant Physiology, 120:645-651) oder die Kältetoleranz, wie offenbart in WO 95/18222, beeinflussen.

Die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen sind im Genom eines *Phytophthora infestans*- Stamms enthalten, die beispielsweise über die Sammlungen wie ATCC oder DSM verfügbar sind. Die Nukleotidsequenz der isolierten *Physcomitrella patens*-cDNA und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *Phytophthora infestans* -PSEs sind in den SEQ ID NO:1 bzw. 2 gezeigt. Es wurden Computeranalysen durchgeführt, die diese Nukleotidsequenzen als Sequenzen klassifizierten und/oder identifizierten, die am Stoffwechsel von Zellmembrankomponenten beteiligte Proteine oder am Transport von Verbindungen über Zellmembranen bzw. Fettsäuren beteiligte Proteine kodieren. Ein EST mit der Datenbankeingabe-Nr. 08\_ck19\_b07 des Erfinders ist Teil der gezeigten Sequenz in SEQ ID NO:1. Inzwischen wurden diese ESTs umbenannt, was zu dem überarbeiteten Namen: pp001019019f führte. Auf analoge Weise wurde das partielle Polypeptid als pp001019019f bezeichnet. Das vollständige Fragment-Insert des ESTs pp001019019f wurde sequenziert und ergab die SEQ ID NO:1, welche die vollständige Sequenz von pp001019019f zeigt. Sie enthält eine vollständigen, funktionell aktiven Klon, von dem sich nach spezifischer Expression in Hefe herausstellte, dass er die gewünschte Substratspezifität aufwies, wie im Beispielteil gezeigt ist. Auch Hefen sind geeignete erfindungsgemäße Organismen, beispielsweise als Wirtszellen für die erfindungsgemäßen Gene, Genkonstrukte oder Vektoren.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Proteine mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog (= identisch) zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 ist. Wie hier verwendet, ist ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, zu mindestens etwa 50 % homolog zu der ausgewählten Aminosäuresequenz, z.B. der gesamten ausgewählten Aminosäuresequenz. Ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, kann auch zu mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 % oder 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz sein.

## 27

Die erfindungsgemäße PSE oder der biologisch aktive Teil oder das Fragment davon kann am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen oder eine oder mehrere der zur Elongation von C<sub>18</sub>-PUFAs benötigten Aktivitäten besitzen, so dass C<sub>22</sub>- oder C<sub>24</sub>-PUFAs sowie verwandte PUFAs erhalten werden.

Verschiedene Aspekte der Erfindung sind eingehender in den folgenden Unterabschnitten beschrieben.

## A. Isolierte Nukleinsäuremoleküle

Eine Ausführungsform der Erfindung ist eine isolierte Nukleinsäure, die von einem Oomyzet stammt und ein Polypeptid kodiert, das C<sub>16</sub>- und/oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist eine isolierte Nukleinsäure, umfassend eine Nukleotidsequenz, die ein Polypeptid kodiert, das C<sub>16</sub>- und/oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure verlängert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus

- a) einer in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz,
- b) einer Nukleinsäuresequenz, die gemäß dem degenerierten genetischen Code von der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz stammt,
- c) Derivate der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, die Polypeptide mit mindestens 50 % Homologie zu der Sequenz kodiert, die die Aminosäuresequenzen in SEQ ID NO:2 kodiert, wobei die Sequenz als C<sub>16</sub>- oder C<sub>18</sub>-Elongase wirkt.

Die oben genannte erfindungsgemäße Nukleinsäure stammt von Organismen, wie Ciliaten, Pilzen, Algen oder Dinoflagellaten, die PUFAs synthetisieren können, vorzugsweise von Pflanzen oder Pilzen, besonders bevorzugt aus der Gattung Phytophthora und am stärksten bevorzugt von Phytophthora infestans.

Ein Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäuremoleküle, die PSE-Polypeptide oder biologisch aktive Teile davon kodieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die zur Verwendung als Hybridisierungs sonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung einer PSE-kodierenden Nukleinsäure (z.B. PSE-DNA) aus-

reichen. Der Begriff "Nukleinsäuremolekül", wie hier verwendet, soll einzelsträngige oder doppelsträngige DNA-Moleküle (z.B. cDNA oder genomische DNA) und/oder RNA-Moleküle (z.B. mRNA) sowie DNA- oder RNA-Analoga, die mittels Nukleotidanaloga erzeugt werden, 5 oder DNA/RNA-Hybride umfassen. Dieser Begriff umfasst zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens etwa 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden Bereichs und mindestens etwa 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes 10 des kodierenden Genbereichs. Das Nukleinsäuremolekül kann einzelsträngig oder doppelsträngig sein, ist aber vorzugsweise doppelsträngige DNA. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure 15 hat vorzugsweise keine Sequenzen, welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z.B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei verschiedenen Ausführungsformen kann das isolierte PSE-Nukleinsäuremolekül zum 20 Beispiel weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt (z.B. eine *Physcomitrella patens*-Zelle) flankieren. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül, wie ein cDNA- 25 Molekül, kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

30

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 oder eines Teils davon, kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenz- 35 information isoliert werden. Beispielsweise kann eine *Phytophthora infestans*-cDNA aus einer *P. infestans*-Bank isoliert werden, indem die vollständige SEQ ID NO:1 oder ein Teil davon als Hybridisierungssonde sowie Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., *Molecular Cloning: 40 A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO:1 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei 45 Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen davon, insbesondere Regionen um His-Box-Motive, siehe Shanklin et al. (1994) *Biochemistry* 33, 12787-12794, erstellt

wurden, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständigen Sequenz der SEQ ID NO:1 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz der SEQ ID NO:1 erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Oomyzetenzellen isolieren (z.B. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18:5294-5299) und cDNA mittels Reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der Basis einer der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer PSE-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

Die in SEQ ID NO:1 gezeigte cDNA umfasst Sequenzen, die PSEs kodieren, (d.h. den "kodierenden Bereich") sowie 5'-untranslatierte Sequenzen und 3'-untranslatierte Sequenzen. Alternativ kann das Nukleinsäuremolekül nur den kodierenden Bereich einer der Sequenzen in SEQ ID NO:1 umfassen oder kann ganze genomische Fragmente, die aus genomischer DNA isoliert sind, enthalten.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäuremolekül, das ein Komplement einer der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen oder eines Teils davon ist. Ein Nukleinsäuremolekül, das zu einer der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen komplementär ist, ist eines, das zu einer der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen ausreichend komplementär ist, dass es mit einer der in SEQ ID NO:1 angegebenen Sequenzen hybridisieren kann, wodurch ein stabiler Duplex entsteht.

Homologa der neuen Elongase-Nukleinsäuresequenz mit der Sequenz SEQ ID NO:1 bedeutet beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis

- 90 % oder 90 bis 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie zu einer in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen oder ihren Homologa, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon, wobei Homologie im
- 5 Sinne der Erfindung Identität bedeutet. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst ein isoliertes erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen oder einen Teil davon hybridisiert, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
- 10 Allelische Varianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für die
- 15 Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der Elongase besitzen, bedeutet Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt 40 % der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem durch
- 20 SEQ ID NO: 2 kodierten Protein.

- Homologa der SEQ ID NO:1 bedeutet beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologa, verkürzte Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA der kodierenden und nicht-
- 25 kodierenden DNA-Sequenz.

- Homologa der SEQ ID NO:1 bedeutet auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere
- 30 Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) modifiziert werden, ohne dass jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren durch Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder dass sie vollständig durch aktivere
- 35 Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

- Überdies kann das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül nur einen Teil des kodierenden Bereichs einer der Sequenzen in SEQ ID NO:1 umfassen, zum Beispiel ein Fragment, das als Sonde oder Primer
- 40 verwendet werden kann, oder ein Fragment, welches einen biologisch aktiven Abschnitt einer PSE kodiert. Die aus der Klonierung des PSE-Gens von *P. infestans* ermittelten Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von PSE-Homologa in
- 45 anderen Zelltypen und Organismen sowie PSE-Homologa aus anderen Oomyzeten oder verwandten Arten gestaltet sind. Die Sonde/der Primer umfasst gewöhnlich im wesentlichen gereinigtes Oligo-

nukleotid. Das Oligonukleotid umfasst gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise etwa 16, stärker bevorzugt etwa 25, 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer der in SEQ ID NO:1 angegebenen Sequenzen, eines Antisense-Stranges einer der in SEQ ID NO:1 angegebenen Sequenzen oder seiner Homologa, Derivate oder Analoga oder natürlich vorkommender Mutanten davon hybridisiert. Primer auf der Basis einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 können in PCR-Reaktionen zur Klonierung von PSE-Homologa verwendet werden. Sonden auf der Basis der PSE-Nukleotidsequenzen können zum Nachweis von Transkripten oder genomischen Sequenzen, die das gleiche oder homologe Proteine kodieren, verwendet werden. Bei bevorzugten Ausführungsformen umfasst die Sonde zudem eine daran gebundene Markierungsgruppe, z.B. ein Radioisotop, eine fluoreszierende Verbindung, ein Enzym oder einen Enzym-Cofaktor. Diese Sonden können als Teil eines Test-Kits für genomische Marker zur Identifizierung von Zellen, die eine PSE misexprimieren, beispielsweise durch Messen einer Menge einer PSE-kodierenden Nukleinsäure in einer Zellenprobe, z.B. Messen der PSE-mRNA-Spiegel, oder zur Bestimmung, ob ein genomisches PSE-Gen mutiert oder deletiert ist, verwendet werden.

Bei einer Ausführungsform kodieren die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle ein Protein oder einen Teil davon, das/der eine Aminosäuresequenz umfasst, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 ist, dass das Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen oder an der Fettsäuresynthese teilzunehmen, beibehält. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "ausreichend homolog" Proteine oder Teile davon, deren Aminosäuresequenzen eine minimale Anzahl identischer oder äquivalenter Aminosäurereste (z.B. einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette, wie ein Aminosäurerest in einer der Sequenzen der SEQ ID NO:2) zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 aufweisen, so dass das Protein oder der Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann. Proteinbestandteile dieser Stoffwechselwege für Membrankomponenten oder Membrantransportsysteme können, wie hier beschrieben, eine Rolle bei der Produktion und Sekretion einer oder mehrerer Feinchemikalien spielen. Beispiele für diese Aktivitäten sind hier ebenfalls beschrieben. Somit trägt die "Funktion einer PSE" entweder direkt oder indirekt zur Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien bei.



Beispiele für PSE-Substratspezifitäten der katalytischen Aktivität sind in Tabelle I angegeben.

- Bei einer weiteren Ausführungsform kodieren Derivate des
- 5 erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls Proteine mit mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie zu einer vollständigen
- 10 Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2. Die Homologie der Aminosäuresequenz wurde über den gesamten Sequenzbereich mit dem Programm PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5, 1989:151-153) bestimmt.
- 15 Teile von Proteinen, die von den erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremolekülen kodiert werden, sind vorzugsweise biologisch aktive Teile einer der PSEs. Wie hier verwendet, soll der Begriff "biologisch aktiver Teil einer PSE", einen Abschnitt, z.B. eine Domäne/ein Motiv, einer PSE umfassen, der am Stoffwechsel von zum
- 20 Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder an der Fettsäuresynthese beteiligt ist oder eine in Tabelle I angegebene Aktivität aufweist. Zur Bestimmung, ob eine PSE oder ein biologisch aktiver Teil davon am
- 25 Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann, kann ein Test der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden. Diese Testverfahren, wie eingehend in Beispiel 8 des Beispielteils beschrieben, sind
- 30 dem Fachmann geläufig.

- Zusätzliche Nukleinsäurefragmente, die biologisch aktive Abschnitte einer PSE kodieren, lassen sich durch Isolierung eines Teils der in SEQ ID NO:2 dargestellten Sequenz, Exprimieren
- 35 des kodierten Abschnitts der PSE oder des Peptids (z.B. durch rekombinante Expression in vitro) und Bestimmen der Aktivität des kodierten Teils der PSE oder des Peptids herstellen.

- Die Erfindung umfasst zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von
- 40 einer der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen (und Teilen davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit die gleiche PSE kodieren wie diejenige, die von den in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen kodiert wird. Bei einer anderen Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes isoliertes
- 45 Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die ein Protein mit einer in SEQ ID NO:2 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert. Bei einer weiteren Ausführungsform kodiert das erfindungsgemäße

Nukleinsäuremolekül ein Vollängen- *Phytophthora infestans*-Protein, das zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 (die von einem in SEQ ID NO:1 gezeigten offenen Leseraster kodiert wird) im wesentlichen homolog ist.

5

Zusätzlich zu den in SEQ ID NO:1 gezeigten *Phytophthora infestans*-PSE-Nukleotidsequenzen erkennt der Fachmann, dass DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen der PSEs führen, innerhalb einer Population (z.B. der *Phytophthora* 10 *infestans*-Population) existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im PSE-Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund von natürlicher Variation existieren. Wie hier verwendet, bedeuten die Begriffe "Gen" und "rekombinantes Gen" Nukleinsäuremoleküle mit einem offenen Leserahmen, der eine 15 PSE, vorzugsweise eine *Phytophthora infestans*-PSE, kodiert. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz des PSE-Gens. Sämtliche und alle dieser Nukleotidvariationen und daraus resultierende Aminosäurepolymorphismen in PSE, die das Ergebnis natürlicher Variation 20 sind und die funktionelle Aktivität von PSEs nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.

Nukleinsäuremoleküle, die den natürlichen Varianten entsprechen, und nicht *Phytophthora infestans*-Homologa, -Derivate und -Analoge 25 der erfindungsgemäßen *Phytophthora infestans*-PSE-cDNA können auf der Grundlage ihrer Homologie zu der hier offenbarten *Phytophthora infestans*-PSE-Nukleinsäure unter Verwendung der *Phytophthora infestans*-cDNA oder eines Teils davon als Hybridisierungssonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter 30 stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 umfasst. Bei anderen 35 Ausführungsformen ist die Nukleinsäure mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide lang. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60 % homolog zueinander sind, 40 gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass Sequenzen, die mindestens etwa 65 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten 45 Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6., finden. Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Bei-

spiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodium citrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis 65°C.

- 5 Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Temperatur unterscheidet sich beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen 10 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im oben- genannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50 % Formamid, ist die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind 15 die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen 30°C und 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungs- 20 temperaturen sind beispielsweise für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehr- büchern, wie dem vorstehend erwähnten oder aus den folgenden 25 Lehrbüchern Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsgb.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford 30 University Press, Oxford, bestimmt werden können. Dem Fachmann ist bekannt, dass die Art und Zeit der Entwicklung der Hybridisierungsergebnisse einen Einfluss auf das Hybridisierungsergebnis hat. In einfachen Versuchen ist er in der Lage die Entwicklungs- bedingungen so zu optimieren, dass die vorgenannte Hybridisierung 35 zuverlässige sichere Ergebnisse liefert.

Vorzugsweise entspricht ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten Bedingungen an eine Sequenz der SEQ ID NO:1 hybridisiert, einem natürlich vorkommenden 40 Nukleinsäuremolekül. Wie hier verwendet, betrifft ein "natürlich vorkommendes" Nukleinsäuremolekül ein RNA- oder DNA-Molekül mit einer Nukleotidsequenz, die in der Natur vorkommt (z.B. ein natürliches Protein kodiert). Bei einer Ausführungsform kodiert die Nukleinsäure eine natürliche vorkommendes Phytophthora 45 infestans -PSE.

Zusätzlich zu natürlich vorkommenden Varianten der PSE-Sequenz, die in der Population existieren können, erkennt der Fachmann ferner, dass auch Änderungen durch Mutation in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 eingebracht werden können, was zu

5 Änderungen der Aminosäuresequenz der kodierten PSE führt, ohne dass die Funktionsfähigkeit des PSE-Proteins beeinträchtigt wird. Beispielsweise lassen sich Nukleotidsusbtitutionen, die an "nicht-essentiellen" Aminosäureresten zu Aminosäuresubstitutionen führen, in einer Sequenz der SEQ ID NO:1 herstellen. Ein "nicht-

10 essentieller" Aminosäurerest ist ein Rest, der sich in einer Wildtypsequenz einer der PSEs (SEQ ID NO:2) verändern lässt, ohne dass die Aktivität der PSE verändert wird, wohingegen ein "essentieller" Aminosäurerest für die PSE-Aktivität erforderlich ist. Andere Aminosäurereste (z.B. diejenigen, die in der

15 Domäne mit PSE-Aktivität nicht konserviert oder lediglich semi-konserviert sind) können jedoch für die Aktivität nicht essentiell sein und lassen sich somit wahrscheinlich verändern, ohne dass die PSE-Aktivität verändert wird.

20 Folglich betrifft in weiterer Aspekt der Erfindung Nukleinsäuremoleküle, die PSEs kodieren, die veränderte Aminosäurereste enthalten, die für die PSE-Aktivität nicht essentiell sind. Diese PSEs unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz von einer Sequenz in SEQ ID NO:2 und behalten dennoch zumindest eine der

25 hier beschriebenen PSE-Aktivitäten. Das isolierte Nukleinsäuremolekül umfasst bei einer Ausführungsform eine Nukleotidsequenz, die ein Protein kodiert, wobei das Protein eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 50 % Homologie zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 umfasst und am Stoffwechsel von zum Aufbau von

30 Zellmembranen in *Phytophthora infestans* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder am Fettsäurestoffwechsel beteiligt ist oder eine oder mehrere der in Tabelle I aufgeführten Aktivitäten besitzt. Das von dem Nukleinsäuremolekül kodierte Protein ist vorzugsweise

35 mindestens etwa 50 bis 60 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO:2, stärker bevorzugt mindestens etwa 60 bis 70 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO:2, noch stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO:2 und am stärksten bevorzugt

40 mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 % oder 99 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO:2.

Zur Bestimmung der prozentualen Homologie von zwei Aminosäuresequenzen (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO:2 und einer

45 mutierten Form davon) oder von zwei Nukleinsäuren werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins

oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, um ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann  
5 verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO:2) durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz (z.B. einer mutierten Form der aus SEQ ID NO:2 ausgewählten Sequenz) belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser  
10 Position homolog (d.h. Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Homologie", wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an identischen Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h. % Homologie = Anzahl der  
15 identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen x 100).

Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine PSE kodiert, die zu einer Proteinsequenz der SEQ ID NO:2 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen  
20 oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 erzeugt werden, so dass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das kodierte Protein eingebracht werden. Mutationen können in eine der Sequenzen der SEQ ID NO:1 durch Standardtechniken, wie stellenspezifische (= site directed)  
25 Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten hergestellt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren  
30 Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin,  
40 Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer PSE wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder  
45 einen Teil der PSE-kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können nach der hier beschriebenen PSE-Aktivität durchmustert

werden, um Mutanten zu identifizieren, die PSE-Aktivität beibehalten. Nach der Mutagenese einer der Sequenzen der SEQ ID NO:1 kann das kodierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann z.B. unter Verwendung der hier  
5 beschriebenen Tests (siehe Beispielteil) bestimmt werden.

Zusätzlich zu den Nukleinsäuremolekülen, welche die vorstehend beschriebenen PSEs kodieren, betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle, die "Antisense" dazu  
10 sind. Eine "Antisense"-Nukleinsäure umfasst eine Nukleotidsequenz, die zu einer "Sense"-Nukleinsäure, welche ein Protein kodiert, komplementär ist, z.B. komplementär zum kodierenden Strang eines doppelsträngigen cDNA-Moleküls oder komplementär zu einer mRNA-Sequenz. Eine Antisense-Nukleinsäure kann folglich  
15 über Wasserstoffbrückenbindungen an eine Sense-Nukleinsäure binden. Die Antisense-Nukleinsäure kann zu einem gesamten PSE-kodierenden Strang oder nur zu einem Teil davon komplementär sein. Bei einer Ausführungsform ist ein Antisense-Nukleinsäuremolekül "Antisense" zu einem "kodierenden Bereich" des kodierenden  
20 den Strangs einer Nukleotidsequenz, die eine PSE kodiert. Der Begriff "kodierender Bereich" betrifft den Bereich der Nukleotidsequenz, der Codons umfasst, die in Aminosäurereste translatiert werden (z.B. den gesamten kodierenden Bereich, der mit dem Stopcodon beginnt und endet, d.h. dem letzten Codon vor dem Stop-  
25 codon). Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül "Antisense" zu einem "nicht-kodierenden Bereich" des kodierenden Strangs einer Nukleotidsequenz, die PSE kodiert. Der Begriff "nicht-kodierender Bereich" betrifft  
30 5'- und 3'-Sequenzen, die den kodierenden Bereich flankieren und nicht in Aminosäuren translatiert werden (d.h. die man auch als 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche bezeichnet).

Unter Voraussetzung der hier offenbarten PSE-kodierenden Sequenzen des kodierenden Stranges (z.B. die in SEQ ID NO:1  
35 dargestellten Sequenzen) können erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuren gemäß den Regeln der Watson-Crick-Basenpaarung gestaltet werden. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann komplementär zum gesamten kodierenden Bereich von PSE-mRNA sein, ist aber stärker bevorzugt ein Oligonukleotid, das nur zu einem Teil des  
40 kodierenden oder nicht-kodierenden Bereichs von PSE-mRNA "Antisense" ist. Das Antisense-Oligonukleotid kann z.B. zu dem Bereich, der die Translationsstartstelle von PSE-mRNA umgibt, komplementär sein. Ein Antisense-Oligonukleotid kann z.B. etwa 5,  
10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 und mehr Nukleotide lang  
45 sein. Eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure kann unter Verwendung chemischer Synthese und enzymatischer Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter Verfahren konstruiert

werden. Eine Antisense-Nukleinsäure (z.B. ein Antisense-Oligonukleotid) kann z.B. chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder verschiedentlich modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so gestaltet sind, dass sie

5 die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen oder die physikalische Stabilität des zwischen der Antisense- und der Sense-Nukleinsäure gebildeten Duplexes erhöhen, beispielsweise können Phosphorthioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele für modifizierte Nukleotide, die zur

10 Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet werden können, sind u.a. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Beta-D-Galactosylqueosin, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin,

15 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil,

20 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure (v), Wybutoxosin, Pseudouracil, Queosin, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure (v), 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-

25 carboxypropyl)uracil, (acp3)w und 2,6-Diaminopurin. Die Antisense-Nukleinsäure kann alternativ biologisch unter Verwendung eines Expressionsvektors hergestellt werden, in den eine Nukleinsäure in Antisense-Richtung subkloniert worden ist (d.h. RNA, die von der eingebrachten Nukleinsäure transkribiert wird,

30 ist zu einer Zielnukleinsäure von Interesse in Antisense-Richtung orientiert, was im nachstehenden Unterabschnitt weiter beschrieben ist).

Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuremoleküle werden

35 üblicherweise an eine Zelle verabreicht oder in situ erzeugt, so dass sie mit der zellulären mRNA und/oder der genomischen DNA, die eine PSE kodiert, hybridisieren oder daran binden, um dadurch die Expression des Proteins, z.B. durch Hemmung der Transkription und/oder Translation, zu hemmen. Die Hybridisierung kann durch

40 herkömmliche Nukleotidkomplementarität unter Bildung eines stabilen Duplexes oder z.B. im Fall eines Antisense-Nukleinsäuremoleküls, das DNA-Duplexes bindet, durch spezifische Wechselwirkungen in der großen Furche der Doppelhelix erfolgen. Das Antisense-Molekül kann so modifiziert sein, dass es spezifisch an

45 einen Rezeptor oder an ein auf einer ausgewählten Zelloberfläche exprimiertes Antigen bindet, z.B. durch Binden des Antisense-Nukleinsäuremoleküls an ein Peptid oder einen Antikörper, das/der

an einen Zelloberflächenrezeptor oder ein Antigen bindet. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann auch unter Verwendung der hier beschriebenen Vektoren den Zellen zugeführt werden. Zur Erzielung ausreichender intrazellulärer Konzentrationen der Antisense-Moleküle sind Vektorkonstrukte, in denen sich das Antisense-Nukleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines starken prokaryotischen, viralen oder eukaryotischen, einschließlich pflanzlichen, Promotors befindet, bevorzugt.

10 Bei einer weiteren Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül ein  $\alpha$ -anomerer Nukleinsäuremolekül. Ein  $\alpha$ -anomerer Nukleinsäuremolekül bildet spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA, wobei die Stränge im Gegensatz zu gewöhnlichen  $\beta$ -Einheiten parallel zueinander verlaufen. (Gaultier  
15 et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-6641). Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann zudem ein 2'-O-Methylribonukleotid (Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) oder ein chimäres RNA-DNA-Analogon (Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330) umfassen.

20 Bei einer weiteren Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure ein Ribozym. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die eine einzelsträngige Nukleinsäure, wie eine mRNA, spalten können, zu der sie einen  
25 komplementären Bereich haben. Somit können Ribozyme (z.B. Hammerhead-Ribozyme (beschrieben in Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591)) zur katalytischen Spaltung von PSE-mRNA-Transkripten verwendet werden, um dadurch die Translation von PSE-mRNA zu hemmen. Ein Ribozym mit Spezifität für eine  
30 PSE-kodierende Nukleinsäure kann auf der Basis der Nukleotidsequenz einer hier offenbarten PSE-cDNA (d.h. 38\_ck21\_g07fwd in SEQ ID NO:1) oder auf der Basis einer gemäß den in dieser Erfindung gelehrt Verfahren zu isolierenden heterologen Sequenz gestaltet werden. Beispielsweise kann ein Derivat einer Tetra-  
35 hymena-L-19-IVS-RNA konstruiert werden, wobei die Nukleotidsequenz der aktiven Stelle komplementär zu der Nukleotidsequenz ist, die in einer PSE-kodierenden mRNA gespalten werden soll. Siehe z.B. Cech et al., US-Patent Nr. 4,987,071 und Cech et al., US-Patent Nr. 5,116,742. Alternativ kann PSE-mRNA zur Selektion  
40 einer katalytischen RNA mit einer spezifischen Ribonukleaseaktivität aus einem Pool von RNA-Molekülen verwendet werden. Siehe z.B. Bartel, D., und Szostak, J.W. (1993) Science 261:1411-1418.

45 Alternativ lässt sich die PSE-Gen-Expression hemmen, indem Nukleotidsequenzen, die komplementär zum regulatorischen Bereich einer PSE-Nukleotidsequenz (z.B. einem PSE-Promotor



und/oder -Enhancer) sind, so dirigiert werden, dass Dreifach-helix-Strukturen gebildet werden, welche die Transkription eines PSE-Gens in Zielzellen hemmen. Siehe allgemein Helene, C. (1991) Anticancer Drug Res. 6(6) 569-84; Helene, C., et al. (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27-36; und Maher. L.J. (1992) Bioassays 14(12):807-815.

In einer weiteren Alternative lässt sich die PSE-Gen-Expression durch Co-Suppression hemmen, auch eine gleichzeitige Expression eines kombinierten Antisense/Sense-Strang (RNAi-Technik) ist vorteilhaft möglich.

#### B. Genkonstrukt

15 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein neues Genkonstrukt, was eine isolierte Nukleinsäure bedeutet, die von einer Pflanze oder einem Pilz stammt und ein Polypeptid kodiert, das C<sub>16</sub>- und/oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert, 20 oder die Gensequenz der SEQ ID NO:1, ihre Homologa, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulations-signalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der Genexpression, verbunden sind. Beispiele für diese Regulationssequenzen sind Sequenzen, an die Induktoren oder Repressoren binden und so die 25 Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und, wenn geeignet, genetisch modifiziert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet worden ist und 30 die Expression der Gene gesteigert worden ist. Das Genkonstrukt kann jedoch auch eine einfachere Struktur haben, d.h. dass keine zusätzlichen Regulationssignale vor der Sequenz SEQ ID NO:1 oder ihren Homologa inseriert worden sind und der natürliche Promotor mit seiner Regulation nicht deletiert worden ist. Statt dessen 35 ist die natürliche Regulationssequenz so mutiert worden, dass keine Regulation mehr stattfindet und die Genexpression verstärkt ist. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte Enhancer-Sequenzen, die funktionsfähig mit dem Promotor verbunden sind und die gesteigerte Expression der 40 Nukleinsäuresequenz ermöglichen, umfassen. Es ist auch möglich, am 3'-Ende der DNA-Sequenzen zusätzlich vorteilhafte Sequenzen zu inserieren, beispielsweise weitere Regulationselemente oder Terminatoren. Die Elongasegene können im Genkonstrukt in einer oder mehreren Kopien vorliegen. Es ist vorteilhaft für die 45 Insertion weiterer Gene in Organismen, wenn weitere Gene im Genkonstrukt vorliegen.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen beispielsweise in Promotoren vor, wie dem cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI<sup>q</sup>, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-,  $\lambda$ -P<sub>R</sub>- oder  $\lambda$ -P<sub>L</sub>-Promotor und werden vorteilhafterweise 5 in Gram-negativen Bakterien angewendet. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen liegen beispielsweise in den Gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF $\alpha$ , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294], PRP1 10 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor vor. In diesem Zusammenhang vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP-A-0 388 186 (Benzylsulfonamid-induzierbar), Plant J. 2, 1992:397-404 (Gatz et al., Tetra- 15 cyclin-induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzisinäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbar) beschriebenen Promotoren. Weitere geeignete Pflanzenpromotoren sind der Promotor von cytosolischer FBPase oder der ST-LSI-Promotor der Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), der 20 Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor aus Glycine max (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodenspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz 25 besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der usp-, LEB4-, Phaseolin- oder Napin-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für Monokotyledonen oder Dikotyledonen verwendet werden können und in US 5,608,152 (Napin-Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Phaseolin- 30 Promotor aus Arabidopsis), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris), WO 91/13980 (Bce4-Promotor aus Brassica), von Bäumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992:233-239 (LEB4-Promotor aus Leguminosen) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich 35 beispielsweise für Monokotyledonen lpt-2- oder lpt-1-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.

Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren 40 Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich synthetische Promotoren zu verwenden.

Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene 45 umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtsorganismen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch

ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Die inserierten Gene können ihren eigenen Promotor haben oder auch unter der Kontrolle des Promotors der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seiner Homologa stehen.

Das Genkonstrukt umfasst vorteilhafterweise zur Expression der anderen vorliegenden Gene weitere 3'- und/oder 5'-terminale Regulationssequenzen zur Steigerung der Expression, die in Abhängigkeit vom gewählten Wirtsorganismus und dem Gen oder den Genen für die optimale Expression ausgewählt werden.

Diese Regulationssequenzen sollen, wie oben erwähnt, die spezifische Expression der Gene und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann je nach dem Wirtsorganismus beispielsweise bedeuten, dass das Gen nur nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die Regulationssequenzen oder -faktoren können außerdem vorzugsweise eine vorteilhafte Wirkung auf die Expression der eingebrachten Gene haben und diese somit steigern. Auf diese Weise ist es möglich, dass die Regulationselemente unter Verwendung starker Transkriptionssignale, wie Promotoren und/oder Enhancer, vorteilhafterweise auf Transkriptionsebene verstärkt werden. Es ist jedoch weiterhin auch möglich, die Translation zum Beispiel durch Verbesserung der mRNA-Stabilität zu verstärken.

### 30 C. Rekombinante Expressionsvektoren und Wirtszellen

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, die eine Nukleinsäure enthalten, die eine PSE (oder einen Teil davon) kodieren. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzlichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (z.B. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung und episomale Säugervektoren). Andere Vektoren (z.B. nicht-episomale Säugervektoren) werden beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert.

Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben Expressionsvektoren, die für DNA-Rekombinationstechniken  
5 geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch diese anderen Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren (z.B. replikations-  
10 defiziente Retroviren, Adenoviren und adenoverwandte Viren), die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen. Ferner soll der Begriff Vektor auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare  
15 oder zirkuläre DNA, umfassen.

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren umfassen eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, dass die  
20 rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfasst. In einem  
25 rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", dass die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden sind, so dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz  
30 zugeschriebene Funktion erfüllen (z.B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht wird). Der Begriff "Regulationssequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale)  
35 umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder siehe: Gruber und Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsgb.: Glick und Thompson,  
40 Kapitel 7, 89-108, einschließlich der Literaturstellen darin. Regulationssequenzen umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, welche die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten  
45 Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß, dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des

gewünschten Proteins usw., abhängen kann. Die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren können in Wirtszellen eingebracht werden, um dadurch Proteine oder Peptide, einschließlich Fusionsproteinen oder -peptiden, herzustellen, die von den Nukleinsäuren, wie hier 5 beschrieben, kodiert werden (z.B. PSEs, mutante Formen von PSEs, Fusionsproteine usw.).

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von PSEs in prokaryotischen oder eukaryotischen 10 Zellen gestaltet sein. Beispielsweise können PSE-Gene in bakteriellen Zellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8:423-488; van den 15 Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous 20 fungi", in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F., et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen (Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology*.1, 3:239-251), Ciliaten der Typen: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, 25 Platyophrya, Potomacus, Pseudocohnilembus, Euplotes, Engelmaniella und Stylonychia, insbesondere der Gattung Stylonychia lemnae, mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency 30 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants" *Plant Cell Rep.*:583-586; *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7, S.71-119 (1993); F.F. White, B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, 35 *Engineering and Utilization*, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225 (und darin zitierte Literaturstellen)) oder nicht-humanen Säugerzellen exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, *Gene 40 Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-Promotor-Regulationssequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

## 45

- Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, welche die Expression von Fusions- oder nicht-Fusionsproteinen steuern. Fusionsvektoren fügen eine Reihe von Aminosäuren an ein darin kodiertes Protein an, gewöhnlich am Amino-terminus des rekombinanten Proteins, aber auch am C-Terminus oder fusioniert innerhalb geeigneter Bereiche in den Proteinen. Diese Fusionsvektoren haben gewöhnlich drei Aufgaben: 1) die Verstärkung der Expression von rekombinantem Protein; 2) die Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins und 3) die Unterstützung der Reinigung des rekombinanten Proteins durch Wirkung als Ligand bei der Affinitätsreinigung. Bei Fusions-Expressionsvektoren wird oft eine proteolytische Spaltstelle an der Verbindungsstelle der Fusionseinheit und des rekombinanten Proteins eingebracht, so dass die Abtrennung des rekombinanten Proteins von der Fusionseinheit nach der Reinigung des Fusionsproteins möglich ist. Diese Enzyme und ihre entsprechenden Erkennungssequenzen umfassen Faktor Xa, Thrombin und Enterokinase.
- Typische Fusions-Expressionsvektoren sind u.a. pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B., und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird. Bei einer Ausführungsform ist die PSE-kodierende Sequenz in einen pGEX-Expressionsvektor kloniert, so dass ein Vektor erzeugt wird, der ein Fusionsprotein kodiert, das vom N-Terminus zum C-Terminus GST-Thrombin-Spaltstelle-X-Protein umfasst. Das Fusionsprotein kann durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathion-Agarose-Harz gereinigt werden. Rekombinante PSE, die nicht an GST fusioniert ist, kann durch Spaltung des Fusionsproteins mit Thrombin gewonnen werden.
- Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-E. coli-Expressionsvektoren sind u.a. pTrc (Amann et al. (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression vom pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7- $\phi$ 10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gnl) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem

residenten  $\lambda$ -Prophagen bereitgestellt, der ein T7  $\phi$ 1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem  
5 Fachmann bekannt, diese Vektoren sind beispielsweise in *E. coli*  
pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie  
pUC18 oder pUC19, die M13mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2,  
pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1, ?gt11 or pBdCI,  
in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus*  
10 pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667.

Eine Strategie zur Maximierung der Expression von rekombinantem  
Protein ist die Expression des Proteins in einem Wirtsbakterium,  
dessen Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung des rekombinanten  
15 Proteins gestört ist (Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien  
(1990) 119-128). Eine weitere Strategie ist die Veränderung der  
Nukleinsäuresequenz der in einen Expressionsvektor zu inserieren-  
den Nukleinsäure, so dass die einzelnen Codons für jede Amino-  
20 säure diejenigen sind, die vorzugsweise in einem zur Expression  
ausgewählten Bakterium, wie *C. glutamicum*, verwendet werden  
(Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Diese  
Veränderung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen erfolgt  
durch Standard-DNA-Synthesetechniken.

25 Bei einer weiteren Ausführungsform ist der PSE-Expressionsvektor  
ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression  
in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYepSec1 (Baldari et al.  
(1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982)  
30 *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123)  
sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und  
Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung  
in anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen  
diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel,  
35 C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector  
development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of fungi*, J.F. Peberdy et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge  
University Press: Cambridge, oder in: *More Gene Manipulations in Fungi* [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic  
40 Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispiels-  
weise 2 $\mu$ M, pAG-1, YEpl6, YEpl3 oder pEMBLye23.

Alternativ können die erfindungsgemäßen PSEs in Insektenzellen  
unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert  
45 werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen  
in gezüchteten Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen) verfügbar sind,  
umfassen die pAc-Reihe (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.*..

3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick  
15 über mögliche geeignete Vektoren. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und sind zum Beispiel beschrieben in: Cloning Vectors (Hrsgb. Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

10 Bei noch einer weiteren Ausführungsform wird eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in Säugerzellen unter Verwendung eines Säuger-Expressionsvektors exprimiert. Beispiele für Säuger-Expressionsvektoren umfassen pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) und PMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195). Bei der

15 Verwendung in Säugerzellen werden die Kontrollfunktionen des Expressionsvektors oft von viralen Regulationselementen bereitgestellt. Üblicherweise verwendete Promotoren stammen z.B. aus Polyoma, Adenovirus2, Cytomegalievirus und Simian Virus 40. Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und  
20 eukaryotische Zellen siehe in den Kapiteln 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

25 Bei einer anderen Ausführungsform kann der rekombinante Säuger-Expressionsvektor die Expression der Nukleinsäure vorzugsweise in einem bestimmten Zelltyp steuern (z.B. werden gewebespezifische Regulationselemente zur Expression der Nukleinsäure verwendet).

30 Gewebespezifische Regulationselemente sind im Fachgebiet bekannt. Nicht beschränkende Beispiele für geeignete gewebespezifische Promotoren sind u.a. der Albuminpromotor (leberspezifisch; Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1:268-277), lymphoidspezifische Promotoren (Calame und Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275),

35 insbesondere Promotoren von T-Zellrezeptoren (Winoto und Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) und Immunglobulinen (Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740; Queen und Baltimore (1983) Cell 33:741-748), neuronspezifische Promotoren (z.B. Neurofilament-Promotor; Byrne und Ruddie (1989) PNAS 86:5473-5477), pankreas-  
40 spezifische Promotoren (Edlund et al., (1985) Science

230:912-916) und milchdrüsenspezifische Promotoren (z.B. Milchserum-Promotor; US-Patent Nr. 4,873,316 und Europäische Patentanmeldung-Veröffentlichung Nr. 264,166). Auch entwicklungsregulierte Promotoren sind umfasst, z.B. die hox-Promotoren  
45 der Maus (Kessel und Gruss (1990) Science 249:374-379) und der Fetoprotein-Promotor (Campes und Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546).



## 48

Bei einer weiteren Ausführungsform können die erfindungsgemäßen PSEs in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren  
5 Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left  
10 border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

15 Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription,  
20 erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus Agrobacterium tumefaciens-t-DNA stammen, wie das als Octopinsynthase bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch  
25 alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind geeignet.

Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette  
30 vorzugsweise andere funktionsfähig verbunden Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711).

35 Die Pflanzengenexpression muss funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt. Bevorzugt sind Promotoren, welche die konstitutive Expression  
40 herbeiführen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202), wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605 und WO 84/02913) oder Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind (siehe eine Übersicht in Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423 und  
5 darin zitierte Literaturstellen), beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper,  
10 Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108).  
15 Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404)  
20 und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant.  
25 Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alphaamylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).

30 Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Nappingen-Promotor aus Raps  
35 (US 5,608,152), der USP-Promotor aus Vicia faba (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67), der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Baeumlein et  
40 al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890  
45 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem

Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die  
5 plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden  
das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige  
Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden.  
Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor,  
sind beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpP-  
10 Promotor aus Arabidopsis, beschrieben in WO 99/46394.

Die Erfindung stellt zudem einen rekombinanten Expressions-  
vektor bereit, umfassend ein erfindungsgemäßes DNA Molekül,  
das in Antisense-Richtung in den Expressionsvektor kloniert  
15 ist. d.h. das DNA-Molekül ist derart mit einer regulatorischen  
Sequenz funktionsfähig verbunden, dass die Expression (durch  
Transkription des DNA-Moleküls) eines RNA-Moleküls, das zur PSE-  
mRNA "Antisense" ist, ermöglicht wird. Es können Regulations-  
sequenzen ausgewählt werden, die funktionsfähig mit einer in  
20 Antisense-Richtung klonierten Nukleinsäure verbunden sind und  
die kontinuierliche Expression des Antisense-RNA-Moleküls in  
einer Vielzahl von Zelltypen steuern, zum Beispiel können virale  
Promotoren und/oder Enhancer oder Regulationssequenzen ausgewählt  
werden, welche die konstitutive, gewebespezifische oder zelltyp-  
25 spezifische Expression von Antisense-RNA steuern. Der Antisense-  
Expressionsvektor kann in Form eines rekombinanten Plasmids,  
Phagemids oder attenuierten Virus vorliegen, in dem Antisense-  
Nukleinsäuren unter der Kontrolle eines hochwirksamen regulatori-  
schen Bereichs produziert werden, dessen Aktivität durch den  
30 Zelltyp bestimmt werden kann, in den der Vektor eingebracht  
worden ist. Eine Erläuterung der Regulation der Genexpression  
mittels Antisense-Genen siehe in Weintraub, H., et al., Anti-  
sense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews -  
Trends in Genetics, Bd. 1(1) 1986.

35 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Wirtszellen, in die  
ein erfindungsgemäßer rekombinanter Expressionsvektor eingebracht  
worden ist. Die Begriffe "Wirtszelle", "rekombinante Wirtszelle"  
und "transgene Wirtszelle" werden hier untereinander austauschbar  
40 verwendet. Selbstverständlich betreffen diese Begriffe nicht  
nur die bestimmte Zielzelle, sondern auch die Nachkommen oder  
potentiellen Nachkommen dieser Zelle. Da in aufeinanderfolgenden  
Generationen aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen be-  
stimmte Modifikationen auftreten können, sind diese Nachkommen  
45 nicht unbedingt mit der Parentalzelle identisch, sind jedoch  
immer noch vom Umfang des Begriffs, wie hier verwendet, umfasst.

## 51

Eine Wirtszelle kann eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle sein. Zum Beispiel kann eine PSE in Bakterienzellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen, Pilzzellen oder Säugerzellen (wie Chinesischer Hamster-Ovarzellen (CHO) oder COS-Zellen), Algen, Ciliaten, Pflanzenzellen, Pilzen oder anderen Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, exprimiert werden. Andere geeignete Wirtszellen sind dem Fachmann geläufig.

Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (z.B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Coprecipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektroporation oder Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Über die stabile Transfektion von Säugerzellen ist bekannt, dass je nach verwendetem Expressionsvektor und verwendeter Transfektionstechnik nur ein kleiner Teil der Zellen die fremde DNA in Genom integriert. Zur Identifikation und Selektion dieser Integranten wird gewöhnlich ein Gen, das einen selektierbaren Marker (z.B. Resistenz gegen Antibiotika) kodiert, zusammen mit dem Gen von Interesse in die Wirtszellen eingebracht. Bevorzugte selektierbare Marker umfassen solche, welche Resistenz gegen Medikamente, wie G418, Hygromycin und Methotrexat, verleihen, oder in Pflanzen solche, welche Resistenz gegen ein Herbizid, wie Glyphosphat oder Glufosinat, verleihen. Weitere geeignete Marker sind beispielsweise Marker, welche Gene kodieren, die an Biosynthesewegen von zum Beispiel Zuckern oder Aminosäuren beteiligt sind, wie  $\beta$ -Galactosidase, *ura3* oder *ilv2*. Marker, welche Gene, wie Luziferase, *gfp* oder andere Fluoreszenzgene kodieren, sind ebenfalls geeignet. Diese Marker lassen sich in Mutanten verwenden, in denen diese Gene nicht funktionell sind, da sie beispielsweise mittels herkömmlicher Verfahren deletiert worden sind. Ferner können Marker, welche eine Nukleinsäure kodieren, die einen selektierbaren Marker kodiert, in eine Wirtszelle auf dem gleichen Vektor eingebracht werden, wie derjenige, der eine

PSE kodiert, oder können auf einem gesonderten Vektor eingebracht werden. Zellen, die mit der eingebrachten Nukleinsäure stabil transfiziert worden sind, können zum Beispiel durch Medikamentenselektion identifiziert werden (z.B. überleben Zellen, die den  
5 selektierbaren Marker integriert haben, wohingegen die anderen Zellen absterben).

Zur Erzeugung eines homolog rekombinierten Mikroorganismus wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines PSE-  
10 Gens enthält, in den eine Deletion, Addition oder Substitution eingebracht worden ist, um dadurch das PSE-Gen zu verändern, z.B. funktionell zu disruptieren. Dieses PSE-Gen ist vorzugsweise ein *Physcomitrella patens*- oder *Phytophthora infestans*-PSE-Gen, es kann jedoch ein Homologon oder Analogon aus einer verwandten  
15 Pflanze oder sogar aus einer Säuger-, Hefe- oder Insektenquelle verwendet werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor so gestaltet, dass das endogene PSE-Gen bei homologer Rekombination funktionell disruptiert wird (d.h. nicht länger ein funktionelles Protein kodiert, auch als Knock-out-  
20 Vektor bezeichnet). Alternativ kann der Vektor so gestaltet sein, dass das endogene PSE-Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert wird, aber immer noch ein funktionelles Protein kodiert (z.B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich so verändert sein, dass dadurch  
25 die Expression der endogenen PSE verändert wird). Zur Erzeugung einer Punktmutation über homologe Rekombination können auch als Chimeraplastie bekannte DNA-RNA-Hybride verwendet werden, die aus Cole-Strauss et al., 1999, *Nucleic Acids Research* 27(5):1323-1330 und Kmiec, *Gene therapy*, 1999, *American Scientist*, 87(3):240-247  
30 bekannt sind.

Im Vektor für die homologe Rekombination ist der veränderte Abschnitt des PSE-Gens an seinem 5'- und 3'-Ende von zusätzlicher Nukleinsäure des PSE-Gens flankiert, so dass homologe Rekombi-  
35 nation zwischen dem exogenen PSE-Gen, das auf dem Vektor vorliegt, und einem endogenen PSE-Gen in einem Mikroorganismus oder einer Pflanze möglich ist. Die zusätzliche flankierende PSE-Nukleinsäure ist für eine erfolgreiche homologe Rekombination mit dem endogenen Gen hinreichend lang. Gewöhnlich sind im Vektor  
40 mehrere hundert Basenpaare bis zu Kilobasen flankierende DNA (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) enthalten (eine Beschreibung von Vektoren zur homologen Rekombination siehe z.B. in Thomas, K.R., und Capecchi, M.R. (1987) *Cell* 51:503 oder der Rekombination in *Physcomitrella patens* auf cDNA-Basis in Strepp et al.,  
45 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (8):4368-4373). Der Vektor wird in einen Mikroorganismus oder eine Pflanzenzelle (z.B. mittels Polyethylenglycol-vermittelter DNA) eingebracht, und

Zellen, in denen das eingebrachte PSE-Gen mit dem endogenen PSE-Gen homolog rekombiniert ist, werden unter Verwendung im Fachgebiet bekannter Techniken selektiert.

- 5 Bei einer anderen Ausführungsform können rekombinante Organismen, wie Mikroorganismen, hergestellt werden, die ausgewählte Systeme enthalten, welche eine regulierte Expression des eingebrachten Gens ermöglichen. Der Einschluss eines PSE-Gens in einem Vektor, wobei es unter die Kontrolle des lac-Operons gebracht wird, 10 ermöglicht z.B. die Expression des PSE-Gens nur in Gegenwart von IPTG. Diese Regulationssysteme sind im Fachgebiet bekannt.

Eine erfindungsgemäße Wirtszelle, wie eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, in Kultur oder auf einem Feld wachsend, 15 kann zur Produktion (d.h. Expression) einer PSE verwendet werden. In Pflanzen kann zusätzlich ein alternatives Verfahren durch direkten Transfer von DNA in sich entwickelnde Blüten über Elektroporation oder Gentransfer mittels Agrobacterium angewendet werden. Die Erfindung stellt folglich ferner Verfahren 20 zur Produktion von PSEs unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wirtszellen bereit. Bei einer Ausführungsform umfasst das Verfahren die Anzucht der erfindungsgemäßen Wirtszelle (in die ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine PSE kodiert, eingebracht worden ist, oder in deren Genom ein Gen eingebracht 25 worden ist, das eine Wildtyp- oder veränderte PSE kodiert) in einem geeigneten Medium, bis die PSE produziert worden ist. Das Verfahren umfasst bei einer weiteren Ausführungsform das Isolieren der PSEs aus dem Medium oder der Wirtszelle.

- 30 Wirtszellen, die im Prinzip zum Aufnehmen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des erfindungsgemäßen neuen Genproduktes oder des erfindungsgemäßen Vektors geeignet sind, sind alle prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Die vorteilhafterweise verwendeten Wirtsorganismen sind Organismen, wie Bakterien, 35 Pilze, Hefen, nicht-humane Tier- oder Pflanzenzellen. Weitere vorteilhafte Organismen sind nicht-humane Tiere oder vorzugsweise Pflanzen oder Teile davon. Pilze, Hefen oder Pflanzen werden vorzugsweise verwendet, besonders bevorzugt Pilze oder Pflanzen, ganz besonders bevorzugt Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, die 40 große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Canola, Erdnuss, Lein, Soja, Diestel, Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, 45 Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölplume, Kokosnuss) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße

## 54

Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss).

- "Transgen" meint bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette (= Genkonstrukt) oder einem Vektor enthaltend besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene Konstruktionen, in denen sich entweder
- a) die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, oder
  - b) eine mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
  - c) (a) und (b)
- sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des natürlichen Promotors der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit dem entsprechenden PSE-Gen - wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise beschrieben in US 5,565,350 oder WO 00/15815.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie

## 55

zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.-  
oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen.

## D. Isolierte PSE

5

- Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft isolierte PSEs und biologisch aktive Teile davon. Ein "isoliertes" oder "gereinigtes" Protein oder ein biologisch aktiver Teil davon ist im wesentlichen frei von zellulärem Material, wenn es durch
- 10 DNA-Rekombinationstechniken produziert wird, oder von chemischen Vorstufen oder andern Chemikalien, wenn es chemisch synthetisiert wird. Der Begriff "im wesentlichen frei von zellulärem Material" umfasst PSE-Präparationen, in denen das Protein von zellulären Komponenten der Zellen, in denen es natürlich oder rekombinant
- 15 produziert wird, getrennt ist. Bei einer Ausführungsform umfasst der Ausdruck "im wesentlichen frei von zellulärem Material" PSE-Präparationen mit weniger als etwa 30 % (bezogen auf das Trockengewicht) nicht-PSE (hier auch als "verunreinigendes Protein" bezeichnet), stärker bevorzugt weniger als etwa 20 % nicht-PSE,
- 20 noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % nicht-PSE und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % nicht-PSE. Wenn die PSE oder ein biologisch aktiver Teil davon rekombinant hergestellt worden ist, ist sie/er auch im wesentlichen frei von Kulturmedium, d.h. das Kulturmedium macht weniger als etwa 20 %,
- 25 stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % des Volumens der Proteinpräparation aus. Der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" umfasst PSE-Präparationen, in denen das Protein von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien
- 30 getrennt ist, die an der Synthese des Proteins beteiligt sind. Bei einer Ausführungsform umfasst der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" PSE-Präparationen mit weniger als etwa 30 % (bezogen auf das Trockengewicht) chemischen Vorstufen oder nicht-PSE-Chemikalien, stärker
- 35 bevorzugt weniger als etwa 20 % chemischen Vorstufen oder nicht-PSE-Chemikalien, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % chemischen Vorstufen oder nicht-PSE-Chemikalien und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % chemischen Vorstufen oder nicht-PSE-Chemikalien. Bei bevorzugten Ausführungsformen weisen iso-
- 40 lierte Proteine oder biologisch aktive Teile davon keine verunreinigenden Proteine aus dem gleichen Organismus auf, aus dem die PSE stammt. Diese Proteine werden gewöhnlich durch rekombinante Expression zum Beispiel einer *Phytophthora infestans* PSE in anderen Pilzen, Pflanzen oder Mikroorganismen, beispielsweise
- 45 weise Bakterien, wie *C. glutamicum*, Pilzen, wie *Mortierella*,



Hefe, wie *Saccharomyces*, oder Ciliaten, Algen oder Pflanzen wie *Phycomitrella patens* oder Ölfruchtpflanzen hergestellt.

Eine erfindungsgemäße isolierte PSE oder ein Teil davon  
5 kann auch am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phytophthora infestans* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen oder am Fettsäurestoffwechsel beteiligt sein oder hat eine oder mehrere der in Tabelle I angegebenen Aktivitäten. Bei bevorzugten Ausführungs-  
10 formen umfasst das Protein oder der Teil davon eine Aminosäuresequenz, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 ist, dass das Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phytophthora infestans* notwendigen Verbindungen oder am Transport  
15 von Molekülen über diese Membranen oder am Fettsäurestoffwechsel teilzunehmen, beibehält. Der Teil des Proteins ist vorzugsweise ein biologisch aktiver Teil, wie hier beschrieben. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat eine erfindungsgemäße PSE eine der in SEQ ID NO:2 gezeigten Aminosäuresequenzen. Bei  
20 einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die PSE eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die, zum Beispiel unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 hybridisiert. Bei noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die PSE eine Aminosäuresequenz,  
25 die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder noch homologer zu einer der Aminosäuresequenzen der  
30 SEQ ID NO:2 ist. Die erfindungsgemäße bevorzugte PSE besitzt vorzugsweise auch mindestens eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten. Zum Beispiel umfasst eine erfindungsgemäße bevorzugte PSE eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die, zum Beispiel unter stringenten Bedingungen,  
35 an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 hybridisiert und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phytophthora infestans* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder am Fettsäurestoffwechsel beteiligt sind oder eine oder mehrere der in Tabelle  
40 I angegebenen Aktivitäten aufweist.

Bei anderen Ausführungsformen ist die PSE im wesentlichen homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 und behält die funktionelle Aktivität des Proteins einer der Sequenzen der  
45 SEQ ID NO:2 bei, ihre Aminosäuresequenz unterscheidet sich jedoch aufgrund von natürlicher Variation oder Mutagenese, wie eingehend im obigen Unterabschnitt I beschrieben. Bei einer weiteren Aus-

führungsform ist die PSE folglich ein Protein, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt  
5 mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 ist und zumindest eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten aufweist. Bei einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein vollständiges Phytophthora infestans-Protein, das im wesentlichen  
10 homolog zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 ist.

Biologisch aktive Teile einer PSE umfassen Peptide, umfassend Aminosäuresequenzen, die von der Aminosäuresequenz einer PSE  
15 hergeleitet sind, z.B. eine in SEQ ID NO:2 gezeigte Aminosäuresequenz oder die Aminosäuresequenz eines Proteins, das zu einer PSE homolog ist, welche weniger Aminosäuren als die Vollängen-PSE oder das Vollängenprotein aufweisen, das zu einer PSE homolog ist, und zumindest eine Aktivität einer PSE aufweisen. Gewöhnlich  
20 umfassen biologisch aktive Teile (Peptide, z.B. Peptide, die zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 oder mehr Aminosäuren lang sind) eine Domäne oder ein Motiv mit mindestens einer Aktivität einer PSE. Überdies können andere biologisch aktive Teile, in denen andere Bereiche des Proteins  
25 deletiert sind, durch rekombinante Techniken hergestellt und bezüglich einer oder mehrerer der hier beschriebenen Aktivitäten untersucht werden. Die biologisch aktiven Teile einer PSE umfassen vorzugsweise ein/eine oder mehrere ausgewählte Domänen/Motive oder Teile davon mit biologischer Aktivität.

30 PSEs werden vorzugsweise durch DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Zum Beispiel wird ein das Protein kodierendes Nukleinsäuremolekül in einen Expressionsvektor (wie vorstehend beschrieben) kloniert, der Expressionsvektor wird in eine Wirtszelle (wie vorstehend beschrieben) eingebracht, und die PSE  
35 wird in der Wirtszelle exprimiert. Die PSE kann dann durch ein geeignetes Reinigungsschema mittels Standard-Proteinreinigungstechniken aus den Zellen isoliert werden. Alternativ zur rekombinanten Expression kann eine PSE, ein -Polypeptid, oder -Peptid  
40 mittels Standard-Peptidsynthesetechniken chemisch synthetisiert werden. Überdies kann native PSE aus Zellen (z.B. Endothelzellen) z.B. unter Verwendung eines Anti-PSE-Antikörpers isoliert werden, der durch Standardtechniken produziert werden kann, wobei eine erfindungsgemäße PSE oder ein Fragment davon verwendet wird.

Die Erfindung stellt auch chimäre PSE-Proteine oder PSE-Fusionsproteine bereit. Wie hier verwendet, umfasst ein "chimäres PSE-Protein" oder "PSE-Fusionsprotein" ein PSE-Polypeptid, das funktionsfähig an ein nicht-PSE-Polypeptid gebunden ist. Ein

5 "PSE-Polypeptid" betrifft ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die einer PSE entspricht, wohingegen ein "nicht-PSE-Polypeptid" ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz betrifft, die einem Protein entspricht, das im wesentlichen nicht homolog zu der PSE ist, z.B. ein Protein, das sich vom der PSE

10 unterscheidet und aus dem gleichen oder einem anderen Organismus stammt. Innerhalb des Fusionsproteins soll der Begriff "funktionsfähig verbunden" bedeuten, dass das PSE-Polypeptid und das nicht-PSE-Polypeptid so miteinander fusioniert sind, dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der verwendeten Sequenz

15 zugeschriebene Funktion erfüllen. Das nicht-PSE-Polypeptid kann an den N-Terminus oder den C-Terminus des PSE-Polypeptids fusioniert sein. Bei einer Ausführungsform ist das Fusionsprotein zum Beispiel ein GST-PSE-Fusionsprotein, bei dem die PSE-Sequenzen an den C-Terminus der GST-Sequenzen fusioniert

20 sind. Diese Fusionsproteine können die Reinigung der rekombinanten PSEs erleichtern. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Fusionsprotein eine PSE, die eine heterologe Signalsequenz an ihrem N-Terminus aufweist. In bestimmten Wirtszellen (z.B. Säuger-Wirtszellen) kann die Expression und/oder Sekretion einer

25 PSE durch Verwendung einer heterologen Signalsequenz gesteigert werden.

Ein erfindungsgemäßes chimäres PSE-Protein oder PSE-Fusionsprotein wird durch Standard-DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Zum Beispiel werden DNA-Fragmente, die unterschiedliche

30 Polypeptidsequenzen kodieren, gemäß herkömmlicher Techniken im Leseraster aneinander ligiert, indem beispielsweise glatte oder überhängende Enden zur Ligation, Restriktionsenzymspaltung zur Bereitstellung geeigneter Enden, Auffüllen kohäsiver Enden,

35 wie erforderlich, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, um ungewollte Verknüpfungen zu vermeiden, und enzymatische Ligation eingesetzt werden. Bei einer weiteren Ausführungsform kann das Fusionsgen durch herkömmliche Techniken, einschließlich DNA-Syntheseautomaten, synthetisiert werden. Alternativ kann eine

40 PCR-Amplifizierung von Genfragmenten unter Verwendung von Ankerprimern durchgeführt werden, die komplementäre Überhänge zwischen aufeinanderfolgenden Genfragmenten erzeugen, die anschließend miteinander hybridisiert und reamplifiziert werden können, so dass eine chimäre Gensequenz erzeugt wird (siehe zum Beispiel

45 Current Protocols in Molecular Biology, Hrsgb. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992). Überdies sind viele Expressionsvektoren kommerziell erhältlich, die bereits eine Fusionseinheit (z.B. ein

## 59

GST-Polypeptid) kodieren. Eine PSE-kodierende Nukleinsäure kann in einen solchen Expressionsvektor kloniert werden, so dass die Fusionsseinheit im Leseraster mit dem PSE-Protein verbunden ist.

- 5 Homologa der PSE können durch Mutagenese, z.B. durch spezifische Punktmutation oder Verkürzung der PSE, erzeugt werden. Der Begriff "Homologon", wie hier verwendet, betrifft eine variante Form der PSE, die als Agonist oder Antagonist der PSE-Aktivität wirkt. Ein Agonist der PSE kann im wesentlichen die gleiche
- 10 Aktivität wie die oder einen Teil der biologischen Aktivitäten der PSE beibehalten. Ein Antagonist der PSE kann eine oder mehrere Aktivitäten der natürlich vorkommenden Form der PSE durch zum Beispiel kompetitive Bindung an ein stromabwärts oder -aufwärts gelegenes Element der Stoffwechselkaskade für Zell-
- 15 membrankomponenten, welche die PSE umfasst, oder durch Bindung an eine PSE, welche den Transport von Verbindungen über Zellmembranen vermittelt, hemmen, wodurch die Translokation gehemmt wird.
- 20 Bei einer alternativen Ausführungsform können Homologa der PSE durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, z.B. Verkürzungsmutanten, der PSE hinsichtlich PSE-Agonisten- oder -Antagonisten-Aktivität identifiziert werden. Bei einer Aus-
- 25 führungsform wird eine variierte Bank von PSE-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt und durch eine variierte Genbank kodiert. Eine variierte Bank von PSE-Varianten kann z.B. durch enzymatische Ligation eines Gemisches von synthetischen Oligonukleotiden in Gensequenzen hergestellt werden, so dass sich ein degenerierter Satz potentieller
- 30 PSE-Sequenzen als individuelle Polypeptide oder alternativ als Satz größerer Fusionsproteine (z.B. für das Phage-Display), die diesen Satz von PSE-Sequenzen enthalten, exprimieren lässt. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller PSE-Homologa aus einer degenerierten Oligonukleotid-
- 35 sequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt und das synthetische Gen dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Satzes von Genen ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher
- 40 Sequenzen, die den gewünschten Satz an potentiellen PSE-Sequenzen kodieren, in einem Gemisch. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind im Fachgebiet bekannt (siehe z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike
- 45 et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

## 60

Zusätzlich können Banken von PSE-Fragmenten zur Herstellung einer variierten Population von PSE-Fragmenten für das Screening und für die anschließende Selektion von Homologa einer PSE verwendet werden. Bei einer Ausführungsform kann eine Bank von Fragmenten

5 der kodierenden Sequenz durch Behandeln eines doppelsträngigen PCR-Fragmentes einer kodierenden PSE-Sequenz mit einer Nuklease unter Bedingungen, unter denen Doppelstrangbrüche nur etwa einmal pro Molekül erfolgen, Denaturieren der doppelsträngigen DNA, Renaturieren der DNA unter Bildung doppelsträngiger DNA,

10 welche Sense/Antisense-Paare von verschiedenen Produkten mit Doppelstrangbrüchen umfassen kann, Entfernen einzelsträngiger Abschnitte aus neu gebildeten Duplices durch Behandlung mit S1-Nuklease und Ligieren der resultierenden Fragmentbank in einen Expressionsvektor erzeugt werden. Mit diesem Verfahren kann eine

15 Expressionsbank hergeleitet werden, die N-terminale, C-terminale und interne Fragmente der PSE verschiedener Größen kodiert.

Im Fachgebiet sind mehrere Techniken für das Screening von Genprodukten in kombinatorischen Banken, die durch Punktmutationen

20 oder Verkürzung hergestellt worden sind, und für das Screening von cDNA-Banken nach Genprodukten mit einer ausgewählten Eigenschaft bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Screening der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese von PSE-Homologa erzeugt worden sind. Die am häufig-

25 sten verwendeten Techniken zum Screening großer Genbanken, die einer Analyse mit hohem Durchsatz unterworfen werden können, umfassen gewöhnlich das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren von geeigneten Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen

30 Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen kodiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert. Recursive-Ensemble-Mutagenese (REM), eine neue Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken erhöht, kann in Kombination

35 mit den Screeningtests zur Identifikation von PSE-Homologa verwendet werden (Arkin und Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

40 Bei einer weiteren Ausführungsform können Tests auf Zellbasis zur Analyse einer variierten PSE-Bank unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Verfahren ausgenutzt werden.

## E. Erfindungsgemäße Verwendungen und Verfahren

Die hier beschriebenen Nukleinsäuremoleküle, Proteine, Protein-homologa, Fusionsproteine, Primer, Vektoren und Wirtszellen  
5 können bei einem oder mehreren der nachstehenden Verfahren verwendet werden: Identifikation von *Phytophthora infestans* und verwandten Organismen, Kartierung der Genome von Organismen, die mit *Phytophthora infestans* verwandt sind, Identifikation und Lokalisierung von *Phytophthora infestans*-Sequenzen von Interesse,  
10 Evolutionsstudien, Bestimmung von PSE-Proteinbereichen, die für die Funktion notwendig sind, Modulation einer PSE-Aktivität; Modulation des Stoffwechsels einer oder mehrerer Zellmembran-komponenten; Modulation des Transmembrantransports einer oder mehrerer Verbindungen sowie Modulation der zellulären Produktion  
15 einer gewünschten Verbindung, wie einer Feinchemikalie. Die erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremoleküle haben eine Vielzahl von Verwendungen. Sie können zunächst zur Identifikation eines Organismus als *Phytophthora infestans* oder als naher Verwandter davon verwendet werden. Sie können auch zur Identifikation des  
20 Vorliegens von *Phytophthora infestans* oder eines Verwandten davon in einer Mischpopulation von Mikroorganismen verwendet werden. Die Erfindung stellt die Nukleinsäuresequenzen einer Reihe von *Phytophthora infestans*-Genen bereit; durch Sondieren der extrahierten genomischen DNA einer Kultur einer einheit-  
25 lichen oder gemischten Population von Mikroorganismen unter stringenten Bedingungen mit einer Sonde, die einen Bereich eines *Phytophthora infestans*-Gens oder von Teilen davon über-spannt, das für diesen Organismus einzigartig ist, kann man bestimmen, ob dieser Organismus vorliegt. *Phytophthora infestans*  
30 selbst wird zwar nicht zur kommerziellen Produktion mehrfach ungesättigter Säuren verwendet, aber Oomyceten sind prinzipiell zur Produktion von PUFAs geeignet. Daher eignen sich PSE-verwandte DNA-Sequenzen besonders zur Verwendung zur PUFA-Produktion in anderen Organismen.

35 Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Protein-moleküle als Marker für spezifische Bereiche des Genoms dienen. Dies ist nicht nur zur Kartierung des Genoms, sondern auch für funktionelle Studien von *Phytophthora infestans*-Proteinen  
40 geeignet. Zur Identifikation des Genombereichs, an den ein bestimmtes DNA-bindendes Protein von *Phytophthora infestans* bindet, könnte das *Phytophthora infestans*-Genom zum Beispiel gespalten werden und die Fragmente mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert werden. Diejenigen, die das Protein binden, können zusätzlich  
45 mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, vorzugsweise mit leicht nachweisbaren Markierungen, sondiert werden; die Bindung eines solchen Nukleinsäuremoleküls an das Genomfragment

- ermöglicht die Lokalisierung des Fragments auf der Genomkarte von *Phytophthora infestans* und erleichtert, wenn dies mehrmals mit unterschiedlichen Enzymen durchgeführt wird, eine rasche Bestimmung der Nukleinsäuresequenz, an die das Protein bindet.
- 5 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem ausreichend homolog zu den Sequenzen verwandter Arten sein, dass diese Nukleinsäuremoleküle als Marker für die Konstruktion einer genomischen Karte bei verwandten Pilzen dienen können.
- 10 Die erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremoleküle eignen sich auch für Evolutions- und Proteinstruktur-Untersuchungen. Die Stoffwechsel- und Transportprozesse, an denen die erfindungsgemäßen Moleküle beteiligt sind, werden von vielen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen genutzt; durch Vergleich der
- 15 Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle mit solchen, die ähnliche Enzyme aus anderen Organismen kodieren, kann der Evolutions-Verwandschaftsgrad der Organismen bestimmt werden. Entsprechend ermöglicht ein solcher Vergleich die Bestimmung, welche Sequenzbereiche konserviert sind und welche nicht, was
- 20 bei der Bestimmung von Bereichen des Proteins hilfreich sein kann, die für die Enzymfunktion essentiell sind. Dieser Typ der Bestimmung ist für Proteinengineering-Untersuchungen wertvoll und kann einen Hinweis darauf geben, wieviel Mutagenese das Protein tolerieren kann, ohne die Funktion zu verlieren.
- 25 Die Manipulation der erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremoleküle kann zur Produktion von PSEs mit funktionellen Unterschieden zu den Wildtyp-PSEs führen. Die Effizienz oder Aktivität dieser Proteine kann verbessert sein, sie können in größeren Anzahlen
- 30 als gewöhnlich in der Zelle zugegen sein, oder ihre Effizienz oder Aktivität kann verringert sein. Verbesserte Effizienz oder Aktivität bedeutet beispielsweise, dass das Enzym eine höhere Selektivität und/oder Aktivität, vorzugsweise eine mindestens 10 % höhere, besonders bevorzugt eine mindestens 20 % höhere
- 35 Aktivität, ganz besonders bevorzugt eine mindestens 30 % höhere Aktivität als das ursprüngliche Enzym aufweist.
- Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung einer erfindungsgemäßen PSE die Ausbeute, Produktion und/oder
- 40 Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie, welche ein solches verändertes Protein enthält, direkt beeinflussen kann. Die Gewinnung von Feinchemikalien-Verbindungen aus Kulturen von Ciliaten, Algen, Pflanzen oder Pilzen im großen Maßstab ist signifikant verbessert, wenn die Zelle die gewünschten
- 45 Verbindungen sezerniert, da diese Verbindungen aus dem Kulturmedium (im Gegensatz zur Extraktion aus der Masse der gezüchteten Zellen) leicht gereinigt werden können. Ansonsten lässt sich die

Reinigung verbessern, wenn die Zelle in vivo Verbindungen in einem spezialisierten Kompartiment mit einer Art Konzentrationsmechanismus speichert. Bei Pflanzen, die PSEs exprimieren, kann ein gesteigerter Transport zu besserer Verteilung innerhalb des Pflanzengewebes und der -organe führen. Durch Vergrößern der Anzahl oder der Aktivität von Transportermolekülen, welche Feinchemikalien aus der Zelle exportieren, kann es möglich sein, die Menge der produzierten Feinchemikalie, die im extrazellulären Medium zugegen ist, zu steigern, wodurch Ernte und Reinigung oder bei Pflanzen eine effizientere Verteilung erleichtert werden. Zur effizienten Überproduktion einer oder mehrerer Feinchemikalien sind dagegen erhöhte Mengen an Cofaktoren, Vorläufermolekülen und Zwischenverbindungen für die geeigneten Biosynthesewege erforderlich. Durch Vergrößern der Anzahl und/oder der Aktivität von Transporterproteinen, die am Import von Nährstoffen, wie Kohlenstoffquellen (d.h. Zuckern), Stickstoffquellen (d.h. Aminosäuren, Ammoniumsalzen), Phosphat und Schwefel, beteiligt sind, kann man die Produktion einer Feinchemikalie aufgrund der Beseitigung aller Einschränkungen des Nährstoffangebots beim Biosyntheseprozess verbessern. Fettsäuren, wie PUFAs, und Lipide, die PUFAs enthalten, sind selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimieren der Aktivität oder Erhöhen der Anzahl einer oder mehrerer erfindungsgemäßer PSEs, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Stören der Aktivität einer oder mehrerer PSEs, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann man somit die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmoleküle in Ciliaten, Algen, Pflanzen, Pilzen, Hefen oder anderen Mikroorganismen steigern.

30

Die Manipulation eines oder mehrerer erfindungsgemäßer PSE-Gene kann ebenfalls zu PSEs mit veränderten Aktivitäten führen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien aus Algen, Pflanzen, Ciliaten oder Pilzen indirekt beeinflussen.

35 Die normalen biochemischen Stoffwechselprozesse führen z.B. zur Produktion einer Vielzahl an Abfallprodukten (z.B. Wasserstoffperoxid und andere reaktive Sauerstoffspezies), die diese Stoffwechsel-Prozesse aktiv stören können (z.B. nitriert Peroxynitrit bekanntlich Tyrosin-Seitenketten, wodurch einige Enzyme mit

40 Tyrosin im aktiven Zentrum inaktiviert werden (Groves, J.T. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2);226-235)). Diese Abfallprodukte werden zwar üblicherweise ausgeschieden, aber die zur fermentativen Produktion im großen Maßstab verwendeten Zellen werden für die Überproduktion einer oder mehrerer Feinchemikalien

45 optimiert und können somit mehr Abfallprodukte produzieren als für eine Wildtypzelle üblich. Durch Optimieren der Aktivität einer oder mehrerer erfindungsgemäßer PSEs, die am Export von Ab-



fallmolekülen beteiligt sind, kann man die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern und eine effiziente Stoffwechselaktivität aufrechterhalten. Auch das Vorliegen hoher intrazellulärer Mengen der gewünschten Feinchemikalie kann tatsächlich für die Zelle  
5 toxisch sein, so dass man durch Steigern der Fähigkeit der Zelle zur Sekretion dieser Verbindungen die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern kann.

Die erfindungsgemäßen PSEs können ferner so manipuliert sein,  
10 dass die relativen Mengen verschiedener Lipid- und Fettsäuremoleküle verändert werden. Dies kann eine entscheidende Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die  
15 Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran beeinflussen, was, wie vorstehend erläutert, den Export von Abfallprodukten oder der produzierten Feinchemikalie oder den Import notwendiger Nährstoffe modifizieren kann. Diese Änderungen  
20 der Membranfluidität können auch die Integrität der Zelle entscheidend beeinflussen; Zellen mit vergleichsweise schwächeren Membranen sind anfälliger gegenüber abiotischen und biotischen Stressbedingungen, welche die Zelle beschädigen oder abtöten können. Durch Manipulieren von PSEs, die an der Produktion von  
25 Fettsäuren und Lipiden für den Membranaufbau beteiligt sind, so dass die resultierende Membran eine Membranzusammensetzung hat, die für die in den Kulturen, die zur Produktion von Feinchemikalien verwendet werden, herrschenden Umweltbedingungen empfänglicher sind, sollte ein größerer Anteil der Zellen  
30 überleben und sich vermehren. Größere Mengen an produzierenden Zellen sollten sich in größeren Ausbeuten, höherer Produktion oder Effizienz der Produktion der Feinchemikalie aus der Kultur manifestieren.

35 Die vorstehend genannten Mutagenesestrategien für PSEs, die zu erhöhten Ausbeuten einer Feinchemikalie führen sollen, sollen nicht beschränkend sein; Variationen dieser Strategien sind dem Fachmann leicht ersichtlich. Unter Verwendung dieser Mechanismen und mit Hilfe der hier offenbarten Mechanismen können die  
40 erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle zur Erzeugung von rekombinanten bzw. transgenen Algen, Ciliaten, Pflanzen, nicht-humanen Tieren, Pilzen oder anderen Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, verwendet werden, die mutierte PSE-Nukleinsäure- und Proteinmoleküle exprimieren, so dass die Ausbeute, Produktion  
45 und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung verbessert wird. Diese gewünschte Verbindung kann ein beliebiges natürliches Produkt von Algen, Ciliaten, Pflanzen, Tieren, Pilzen

oder *C. glutamicum* sein, welches die Endprodukte von Biosynthesewegen und Zwischenprodukte natürlich vorkommender Stoffwechselwege umfasst, sowie Moleküle, die im Stoffwechsel dieser Zellen nicht natürlich vorkommen, die jedoch von den erfindungsgemäßen Zellen produziert werden.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist ein Verfahren zur Produktion von PUFAs, wobei das Verfahren das Züchten eines Organismus, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor umfasst, welche ein Polypeptid kodieren, das C<sub>16</sub>- und/oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül um mindestens zwei Kohlenstoffatome unter Bedingungen, unter denen PUFAs in dem Organismus produziert werden, verlängert, umfasst. Durch dieses Verfahren hergestellte PUFAs lassen sich durch Ernten der Organismen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder von dem Feld, Aufbrechen und/oder Extrahieren des geernteten Materials mit einem organischen Lösungsmittel isolieren. Aus diesem Lösungsmittel kann das Öl, das Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide, Triacylglycerine und/oder freie Fettsäuren mit höherem Gehalt an PUFAs enthält, isoliert werden. Durch basische oder saure Hydrolyse der Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide, Triacylglycerine können die freien Fettsäuren mit höherem Gehalt an PUFAs isoliert werden. Ein höherer Gehalt an PUFAs bedeutet mindestens 5 %, vorzugsweise 10 %, besonders bevorzugt 20 %, ganz besonders bevorzugt 40 % mehr PUFAs als der ursprüngliche Organismus beispielsweise ein Oomycet wie *Phytophthora* oder einer Pflanze wie einer Ölfruchtpflanze, der/die keine zusätzliche Nukleinsäure, die die erfindungsgemäße Elongase kodiert, besitzt. Weiterhin besitzen die vorgenannten Öle, Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide, Triacylglycerine und/oder freie Fettsäuren mit höherem Gehalt an PUFAs eine andere Zusammensetzung als die Zusammensetzung der Ausgangsorganismen. Dies gilt insbesondere für Pflanzen, die längererkettige mehrfach ungesättigte C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren wie DHA, EPA oder ARA natürlicherweise nicht enthalten.

Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten PUFAs C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise drei oder vier Doppelbindungen, besonders bevorzugt drei Doppelbindungen. Diese C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremoleküle lassen sich aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isolieren. Geeignete Organismen sind beispielsweise die vorstehend erwähnten. Bevorzugte Organismen sind transgene Pflanzen.

## 66

Eine erfindungsgemäße Ausführungsform sind Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfassen und von 5 transgenen Pflanzen herrühren.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

10

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefasst werden sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und 15 veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

### Beispiele

#### 20 Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

##### a) Allgemeine Klonierungsverfahren:

Klonierungsverfahren, wie beispielsweise Restriktionsspaltungen, 25 Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose- und Nylonmembranen, Verbindung von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli- und Hefe-Zellen, Züchtung von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA, wurden durchgeführt wie beschrieben in 30 Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) oder Kaiser, Michaelis und Mitchell (1994) "Methods in Yeast Genetics" (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3).

##### 35 b) Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn im Text nicht anders angegeben, in p. A.-Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und 40 Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden unter Verwendung von reinem pyrogenfreiem Wasser, im nachstehenden Text als H<sub>2</sub>O bezeichnet, aus einer Milli-Q-Wassersystem-Wasserreinigungsanlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden 45 bezogen von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Boehringer (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen

(Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Wenn nicht anders angegeben, wurden sie nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

5

#### Beispiel 2: Konstruktion der cDNA-Bank

Zur Konstruktion der cDNA-Bank wurde die Erststrangsynthese unter Verwendung von Reverser Transkriptase aus Maus-Leukämie-Virus

10 (Roche, Mannheim, Deutschland) und Oligo-d(T)-Primern, die Zweitstrangsynthese durch Inkubation mit DNA-Polymerase I, Klenow-Enzym und RNase H-Spaltung bei 12°C (2 Std.), 16°C (1 Std.) und 22°C (1 Std.) erzielt. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C (10 min) gestoppt und anschließend auf Eis überführt.

15 Doppelsträngige DNA-Moleküle wurde mit T4-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) bei 37°C (30 min) mit glatten Enden versehen. Die Nukleotide wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Sephadex-G50-Zentrifugiersäulen entfernt. EcoRI-Adapter (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurden mittels T4-DNA-Ligase (Roche, 12°C, 20 über Nacht) an die cDNA-Enden ligiert und durch Inkubation mit Polynukleotidkinase (Roche, 37°C, 30 min) phosphoryliert. Dieses Gemisch wurde der Trennung auf einem Low-Melting-Agarose-Gel unterworfen. DNA-Moleküle über 300 Basenpaaren wurden aus dem Gel eluiert, Phenol-extrahiert, auf Elutip-D-Säulen (Schleicher 25 und Schüll, Daßel, Deutschland) konzentriert und an Vektorarme ligiert und in lambda-ZAPII-Phagen oder lambda-ZAP-Express-Phagen unter Verwendung des Gigapack Gold-Kits (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verpackt, wobei Material des Herstellers verwendet und seine Anweisungen befolgt wurden.

30

#### Beispiel 3: DNA-Sequenzierung und Computeranalyse

cDNA-Banken, wie im Beispiel 4 beschrieben, wurden zur DNA-Sequenzierung nach Standardverfahren, insbesondere durch das

35 Kettenterminationsverfahren unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland), verwendet. Die Zufallssequenzierung wurde anschließend an die präparative Plasmidgewinnung aus cDNA-Banken über in vivo-Massenausschnitt und Retransformation von 40 DH10B auf Agarplatten durchgeführt (Einzelheiten zu Material und Protokoll von Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Plasmid-DNA wurde aus über Nacht gezüchteten E. coli-Kulturen, die in Luria-Brühe mit Ampicillin (siehe Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)) 45 gezüchtet worden waren, an einem Quiagen-DNA-Präparations-Roboter (Quiagen, Hilden) nach den Protokollen des Herstellers

präpariert. Sequenzierprimer mit den folgenden Nukleotidsequenzen wurden verwendet:

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'  
5 5'-CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3'  
5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'

Die Sequenzen wurden unter Verwendung des Standard-Softwarepakets EST-MAX, das kommerziell von Bio-Max (München, Deutschland) geliefert wird, Prozessiert und kommentiert. Ein Klon mit schwachen Homologien zu bekannten Elongasen wurde eingehender charakterisiert.

Beispiel 4: Identifizierung des PSE1-Gens aus *P. infestans* und Analyse des cDNA-Klons PipSE1

Eine EST-Sequenz (Datenbankeintrag: PI001002014r) wurde aufgrund schwacher Homologie mit bekannten Elongasen unter anderen Kandidatengenen als Zielgen in Betracht gezogen.

Für den Sequenzvergleich wurde das Programm BESTFIT verwendet, d.h. die BLOSUM-Aminosäuresubstitutions-Matrizen, wobei auf Henikoff, S., und Henikoff, J.G. (1992), Amino acid substitution matrices from protein blocks, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, verwiesen wird.

Die Sequenz des Klons mit der Datenbank-Nr. PI001002014r wurde für den Vergleich mit der elol-Peptidsequenz aus Hefe verwendet. Da der neue *P. infestans* Klon nicht vollständig war, wurde ausgehend von der *P. infestans* cDNA Bank der korespondierende full length Klon isoliert (PipSE1). Hierzu wurde eine Digoxigenin-markierte Sonde durch PCR mittels des PCR DIG synthesis kits (Roche) hergestellt, wobei PI001002014 als Template diente. Für die PCR wurden folgende Primer verwendet:

PI-DIGf: cacaccatcatgtacacttactac

PI-DIGr: caacttcttcttcgattcctccac

Die isolierte markierte Sonde wurde für ein Screening der *P. infestans* cDNA Bank verwendet (entsprechend den Angaben des Herstellers, Stratagene). Ein Fragment von 1046 bp Länge wurde isoliert und als PipSE1 bezeichnet. Das Offene-Leseraster ist 837 bp lang und kodiert für ein Protein von 278 Aminosäuren mit einer berechneten Molekularen Masse von 32,1 kDa. Sequenzvergleiche ergaben folgende Sequenzidentitäten, bzw. -ähnlichkeiten: 26 % / 43 % mit der *Physcomitrella patens* PSE1p, 23 % / 37 % mit

der humanen HELOp, 21 % / 41 % mit der GLELOp aus *Mortierella alpina* und 17 % / 36 % mit der Elongase aus *C. elegans*.

#### Beispiel 5: Identifikation von Genen mittels Hybridisierung

5

Gensequenzen lassen sich zur Identifikation homologer oder heterologer Gene aus cDNA- oder genomischen Banken verwenden.

Homologe Gene (d.h. Vollängen-cDNA-Klone, die homolog sind, oder Homologa) lassen sich über Nukleinsäurehybridisierung unter Verwendung von beispielsweise cDNA-Banken isolieren: Je nach der Häufigkeit des Gens von Interesse wurden 100000 bis zu 1000000 rekombinante Bakteriophagen plattiert und auf eine Nylonmembran überführt. Nach der Denaturierung mit Alkali wurde die DNA auf der Membran z.B. durch UV-Vernetzung immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgte bei hoch-stringenten Bedingungen. In wässriger Lösung wurden die Hybridisierung und die Waschschr

10 unter Verwendung von beispielsweise cDNA-Banken isolieren: Je nach der Häufigkeit des Gens von Interesse wurden 100000 bis zu 1000000 rekombinante Bakteriophagen plattiert und auf eine Nylonmembran überführt. Nach der Denaturierung mit Alkali wurde

15 die DNA auf der Membran z.B. durch UV-Vernetzung immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgte bei hoch-stringenten Bedingungen. In wässriger Lösung wurden die Hybridisierung und die Waschschr

20 mittels radioaktiver ( $^{32}\text{P}$ -) Nicktranskription (High Prime, Roche, Mannheim, Deutschland) hergestellt. Die Signale wurden mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Partiell homologe oder heterologe Gene, die verwandt, aber nicht identisch sind, lassen sich analog zum oben beschriebenen Verfahren unter Verwendung niedrig-stringenter Hybridisierungs- und Waschbedingungen identifizieren. Für die wässrige Hybridisierung wurde die Ionenstärke gewöhnlich bei 1 M NaCl gehalten, wobei die Temperatur nach und nach von 68 auf 42°C gesenkt wurde.

30

Die Isolation von Gensequenzen, die nur zu einer einzelnen Domäne von beispielsweise 10 bis 20 Aminosäuren Homologien aufweisen, lässt sich unter Verwendung synthetischer, radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden durchführen. Radioaktiv markierte Oligonukleotide wurden mittels Phosphorylierung des 5'-Endes zweier komplementärer Oligonukleotide mit T4-Polynukleotidkinase hergestellt. Die komplementären Oligonukleotide wurden aneinander hybridisiert und ligiert, so dass Konkatemere entstanden. Die doppelsträngigen Konkatemere wurde beispielsweise durch Nicktranskription radioaktiv markiert. Die Hybridisierung erfolgte gewöhnlich bei niedrig-stringenten Bedingungen unter Verwendung hoher Oligonukleotidkonzentrationen.

## 70

## Oligonukleotid-Hybridisierungslösung:

- 6 x SSC
  - 0,01 M Natriumphosphat
  - 5 1 mM EDTA (pH 8)
  - 0,5 % SDS
  - 100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA
  - 0,1 % fettarme Trockenmilch
- 10 Während der Hybridisierung wurde die Temperatur schrittweise auf 5 bis 10°C unter die berechnete Oligonukleotid-T<sub>m</sub> oder bis auf Raumtemperatur (bedeutet RT = ~ 23°C in allen Experimenten, wenn nicht anders angegeben) gesenkt, gefolgt von Waschschritten und Autoradiographie. Das Waschen wurde mit extrem niedriger
- 15 Stringenz durchgeführt, zum Beispiel 3 Waschschritte unter Verwendung von 4 x SSC. Weitere Einzelheiten sind wie von Sambrook, J., et al. (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, oder Ausubel, F.M., et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley &
- 20 Sons, beschrieben.

Herstellung spezifischer Antikörper beispielsweise unter

## Beispiel 6: Northern-Hybridisierung

- 25 Für die RNA-Hybridisierung wurden 20 µg Gesamt-RNA oder 1 µg poly(A)<sup>+</sup>-RNA mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen mit einer Stärke von 1,25 % unter Verwendung von Formaldehyd, wie beschrieben in Amasino (1986, Anal. Biochem. 152, 304) auf-
- 30 getrennt, mittels Kapillaranziehung unter Verwendung von 10 x SSC auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) übertragen, mittels UV-Licht immobilisiert und 3 Stunden bei 68°C unter Verwendung von Hybridisierungspuffer (10 % Dextransulfat Gew./Vol., 1 M NaCl, 1 % SDS, 100 mg Heringssperma-DNA) vorhybridisiert. Die Markierung der DNA-Sonde mit dem Highprime DNA labeling-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) erfolgte während der Vorhybridisierung unter Verwendung von alpha-<sup>32</sup>P-dCTP (Amersham, Braunschweig, Deutschland). Die Hybridisierung wurde nach Zugabe der markierten DNA-Sonde im gleichen
- 35 Puffer bei 68°C über Nacht durchgeführt. Die Waschschritte wurden zweimal für 15 min unter Verwendung von 2 x SSC und zweimal für 30 min unter Verwendung von 1 x SSC, 1 % SDS, bei 68°C durchgeführt. Die Exposition der verschlossenen Filter wurde bei -70°C für einen Zeitraum von 1 bis 14 T durchgeführt.

## 71

## Beispiel 7: Plasmide für die Pflanzentransformation

Zur Pflanzentransformation können binäre Vektoren, wie pBinAR verwendet werden (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 5 221-230). Die Konstruktion der binären Vektoren kann durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzenpromotor die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA.

10

Die gewebespezifische Expression lässt sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Beispielsweise kann die samenspezifische Expression erreicht werden, indem der Napin- oder der LeB4- oder der USP-Promotor 5' der cDNA einkloniert

15 wird. Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement kann verwendet werden. Zur konstitutiven Expression in der ganzen Pflanze lässt sich der CaMV-35S-Promotor verwenden.

Das exprimierte Protein kann unter Verwendung eines Signal-  
20 peptids, beispielsweise für Plastiden, Mitochondrien oder das Endoplasmatische Retikulum, in ein zelluläres Kompartiment dirigiert werden (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423). Das Signalpeptid wird 5' im Leseraster mit der cDNA einkloniert, um die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsprotein  
25 zu erreichen.

## Beispiel 8: Transformation von Agrobacterium

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann zum  
30 Beispiel unter Verwendung des GV3101- (pMP90-) (Koncz und Schell, Mol. Gen. Genet. 204 (1986) 383-396) oder LBA4404- (Clontech) Agrobacterium tumefaciens-Stamms durchgeführt werden. Die Transformation kann durch Standard-Transformationstechniken durchgeführt werden (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 13 (1984),  
35 4777-4788).

## Beispiel 9: Pflanzentransformation

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann unter  
40 Verwendung von Standard-Transformations- und Regenerations-techniken durchgeführt werden (Gelvin, Stanton B., Schilperoort, Robert A., Plant Molecular Biology Manual, 2. Aufl., Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E.,  
45 Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993, 360 S., ISBN 0-8493-5164-2).



## 72

- Beispielsweise kann Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyltransformation transformiert werden (Moloney et al., Plant Cell Report 8 (1989) 238-242; De Block et al., Plant Physiol. 91 (1989) 694-701). Die Verwendung von Antibiotika für die Agrobacterium- und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation verwendeten binären Vektor und Agrobacterium-Stamm ab. Die Rapsselektion wird gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt.
- 10 Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Flachs lässt sich unter Verwendung von beispielsweise einer von Mlynarova et al. (1994) Plant Cell Report 13:282-285 beschriebenen Technik durchführen.
- 15 Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-0 0424 047 (Pioneer Hi-Bred International) oder in EP-A-0 0397 687, US 5,376,543, US 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden.
- 20 Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchenbeschuss, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).
- 25 Beispiel 10: In vivo-Mutagenese
- Die in vivo-Mutagenese von Mikroorganismen kann mittels Passage der Plasmid- (oder einer anderen Vektor-) DNA durch E. coli oder andere Mikroorganismen (z.B. Bacillus spp. oder Hefen, wie Saccharomyces cerevisiae), bei denen die Fähigkeiten, die Unversehrtheit ihrer genetischen Information aufrechtzuerhalten, gestört ist, erfolgen. Übliche Mutator-Stämme haben Mutationen in den Genen für das DNA-Reparatursystem (z.B. mutHLS, mutD, mutT usw.; als Literaturstelle siehe Rupp, W.D. (1996) DNA repair mechanisms, in: Escherichia coli and Salmonella, S. 2277-2294, ASM: Washington). Diese Stämme sind dem Fachmann bekannt. Die Verwendung dieser Stämme ist beispielsweise in Greener, A., und Callahan, M. (1994) Strategies 7:32-34, erläutert. Der Transfer mutierter DNA-Moleküle in Pflanzen erfolgt vorzugsweise nach Selektion und Test der Mikroorganismen. Transgene Pflanzen werden nach verschiedenen Beispielen im Beispielteil dieses Dokumentes erzeugt.

## 73

Beispiel 11: Untersuchung der Expression eines rekombinanten  
Genproduktes in einem transformierten Organismus

Die Aktivität eines rekombinanten Genproduktes im transformierten  
5 Wirtsorganismus wurde auf der Transkriptions- und/oder der  
Translationsebene gemessen.

Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Menge an Transkrip-  
tion des Gens (ein Hinweis auf die Menge an RNA, die für die  
10 Translation des Genproduktes zur Verfügung steht) ist die Durch-  
führung eines Northern-Blots (als Bezugsstelle siehe Ausubel  
et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley:  
New York, oder den oben erwähnten Beispielteil), wobei ein  
Primer, der so gestaltet ist, dass er an das Gen von Interesse  
15 bindet, mit einer nachweisbaren Markierung (gewöhnlich radioaktiv  
oder chemilumineszent) markiert wird, so dass, wenn die Gesamt-  
RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel auf-  
getrennt, auf eine stabile Matrix transferiert und mit dieser  
Sonde inkubiert wird, die Bindung und das Ausmaß der Bindung der  
20 Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen  
anzeigt. Diese Information zeigt den Grad der Transkription des  
transformierten Gens an. Zelluläre Gesamt-RNA kann aus Zellen,  
Gewebe oder Organen mit mehreren Verfahren, die alle im Fach-  
gebiet bekannt sind, wie zum Beispiel das von Bormann, E.R.,  
25 et al. (1992) Mol. Microbiol. 6:317-326 beschriebene, präpariert  
werden.

Zur Untersuchung des Vorliegens oder der relativen Menge an von  
dieser mRNA translatiertem Protein können Standardtechniken, wie  
30 ein Western-Blot, eingesetzt werden (siehe beispielsweise Ausubel  
et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley:  
New York). Bei diesem Verfahren werden die zellulären Gesamt-  
Proteine extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt,  
auf eine Matrix, wie Nitrozellulose, übertragen und mit einer  
35 Sonde, wie einem Antikörper, der spezifisch an das gewünschte  
Protein bindet, inkubiert. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer  
chemilumineszenten oder kolorimetrischen Markierung versehen,  
die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die Menge  
der beobachteten Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge  
40 des gewünschten, in der Zelle vorliegenden mutierten Proteins an.

## 74

## Beispiel 12: Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen,  
5 Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische  
15 Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological  
25 Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

30 Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily  
35 Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist  
45 es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamt-

## 75

effizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

Bei Fettsäuren, für die keine Standards verfügbar sind, muss die Identität über Derivatisierung und anschließende GC-MS-Analyse gezeigt werden. Beispielsweise muss die Lokalisierung von Fettsäuren mit Dreifachbindung über GC-MS nach Derivatisierung mit

4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998, siehe oben) gezeigt werden.

5 Beispiel 13: Expressionskonstrukte in heterologen mikrobiellen Systemen

Stämme, Wachstumsbedingungen und Plasmide

- Der *Escherichia coli*-Stamm XL1 Blue MRF' kan (Stratagene) wurde zur Subklonierung der neuen Elongase piPSE1 aus *Phytophthora infestans* verwendet. Für die funktionelle Expression dieses Gens verwendeten wir den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm INVSc 1 (Invitrogen Co.). *E. coli* wurde in Luria-Bertini-Brühe (LB, Duchefa, Haarlem, Niederlande) bei 37°C gezüchtet. Wenn nötig, wurde Ampicillin (100 mg/Liter) zugegeben, und 1,5 % Agar (Gew./Vol.) wurde für feste LB-Medien hinzugefügt. *S. cerevisiae* wurde bei 30°C entweder in YPG-Medium oder in komplettem Minimalmedium ohne Uracil (CMdum; siehe in: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.B., Coen, D.M., und Varki, A. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York) mit entweder 2 % (Gew./Vol.) Raffinose oder Glucose gezüchtet. Für feste Medien wurden 2 % (Gew./Vol.) Bacto™-Agar (Difco) hinzugefügt. Die zur Klonierung und Expression verwendeten Plasmide waren pUC18 (Pharmacia) und pYES2 (Invitrogen Co.).

Klonierung und Expression einer PUFA-spezifischen Elongase aus *Phytophthora infestans*

- Für die Expression in Hefe wurde der *Phytophthora infestans* - cDNA-Klon piPSE1, der das PUFA-spezifische Elongase- (PSE1-) Gen kodiert, zuerst so modifiziert, dass eine KpnI-Restriktionsstelle und die Hefe-Konsensussequenz für hoch-effiziente Translation (Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, Cell 44, 283-292) neben dem Startcodon und eine XbaI-Restriktionsstelle, die das Stopcodon flankierte, erhalten wurden. Zur Amplifikation des offenen Leserahmens wurde ein Primerpaar, das komplementär zu dessen 5'- und 3'-Enden war, synthetisiert.

40

ppex1f: cggggtaccacataatgtcgactgagctactgcag

ppex1r: cactagtctagattccaacttcttcttcgattcc

- 45 Die PCR-Reaktion wurde mit Plasmid-DNA als Matrize in einem Thermocycler (Biometra) mit der Pfu-DNA- (Stratagene) Polymerase und dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: 3 min bei 96°C,

## 77

gefolgt von 30 Zyklen mit 30 s bei 96°C, 30 s bei 55°C und 2 min bei 72°C, 1 Zyklus mit 10 min bei 72°C und Stop bei 4°C.

- Die korrekte Größe des amplifizierten DNA-Fragments von 883 bp wurde mittels Agarose-TBE-Gelelektrophorese bestätigt. Die amplifizierte DNA wurde aus dem Gel mit dem QIAquick-Gelextraktionskit (QIAGEN) extrahiert und in die SmaI-Restriktionsstelle des dephosphorylierten Vektors pUC18 unter Verwendung des Sure Clone Ligation Kit (Pharmacia) ligiert, wobei pUCPSE1 erhalten wurde.
- 10 Nach der Transformation von E. coli XL1 Blue MRF' kan wurde eine DNA-Minipräparation (Riggs, M.G., & McLachlan, A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparation. BioTechniques 4, 310-313) an 24 ampicillin-resistenten Transformanten durchgeführt, und positive Klone
- 15 wurden mittels BamHI-Restriktionsanalyse identifiziert. Die Sequenz des klonierten PCR-Produktes wurde mittels Resequenzierung unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) bestätigt.
- 20 Die Plasmid-DNA von pUC-PSE1 wurde zudem mit KpnI/XbaI gespalten und das erhaltene ~900 bp-Fragment in die KpnI/XbaI -Restriktionsstelle des dephosphorylierten Hefe-E. coli-Shuttlevektors pYES2 ligiert, wobei pY2PSE1 erhalten wurde. Nach der Transformation
- 25 von E. coli und DNA-Minipräparation aus den Transformaten wurde die Orientierung des DNA-Fragments im Vektor durch HindIII-Spaltung überprüft. Ein Klon wurde für die DNA-Maxipräparation mit dem Nucleobond® AX 500 Plasmid-DNA-Extraktionskit (Macherey-Nagel, Düringen) gezüchtet.
- 30 Saccharomyces INVSc1 wurde mit pY2PSE1 und pYES2 mittels eines modifizierten PEG/Lithiumacetat-Protokolls transformiert (Ausubel et al., 1995). Nach der Selektion auf CMdum-Agarplatten mit 2 % Glucose wurden vier pY2PSE1-Transformanten (pY2PSE1a-d) und
- 35 eine pYES2-Transformante zur weiteren Züchtung und funktionellen Expression ausgewählt.

#### Funktionelle Expression einer Elongaseaktivität in Hefe

#### 40 Vorkultur:

- 20 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2 % (Gew./Vol.) Raffinose wurden mit den transgenen Hefeklonen (pY2PSE1a-d, pYES2) angeimpft und 3 T bei 30°C, 200 rpm gezüchtet, bis eine optische Dichte bei
- 45 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 1,5-2 erreicht war.

## Hauptkultur:

Für die Expression wurden 20 ml CMDum-Flüssigmedium mit 2 % Raffinose und 1 % (Vol./Vol.) Tergitol NP-40 mit  $\gamma$ -Linolensäure 5 ( $\gamma$ -18:3) auf eine Endkonzentration von 0,003 % (Gew./Vol.) angereichert. Die Medien wurden mit den Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 mit 2 % (Gew./Vol.) Galaktose für 16 Std. induziert, wonach die Kulturen eine OD<sub>600</sub> von 0,8-1,2 erreicht hatten.

10

## Fettsäureanalyse

Die Gesamt-Fettsäuren wurden aus Hefekulturen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Davon wurden Zellen 15 von 5 ml Kultur mittels Zentrifugation (1000 x g, 10 min, 4°C) geerntet und einmal mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0, gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Zur Herstellung des Fettsäuremethylester (FAMES) wurden die Zellsedimente mit 1 M methanolischer H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 2 % (Vol./Vol.) Dimethoxypropan für 20 1 Std. bei 80°C behandelt. Die FAMES wurden zweimal mit 2 ml Petrolether extrahiert, einmal mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0, und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das organische Lösungsmittel wurde unter einem Argonstrom verdampft, und die FAMES wurden in 50  $\mu$ l Petrolether gelöst. Die 25 Proben wurden auf einer ZEBRON-ZB-Wax-Kapillarsäule (30 m, 0,32 mm, 0,25  $\mu$ m; Phenomenex) in einem Hewlett Packard-6850-Gaschromatograph mit einem Flammenionisationsdetektor aufgetrennt. Die Ofentemperatur wurde von 70°C (1 min halten) bis 200°C mit einer Rate von 20°C/min, dann auf 250°C (5 min halten) mit einer 30 Rate von 5°C/min und schließlich auf 260°C mit einer Rate von 5°C/min programmiert. Stickstoff wurde als Trägergas verwendet (4,5 ml/min bei 70°C). Die Fettsäuren wurden durch Vergleich mit Retentionszeiten von FAME-Standards (SIGMA) identifiziert.

## 35 Expressionsanalyse.

Die Fettsäuremuster von fünf transgenen Hefestämmen in Mol.-% sind in Tabelle I gezeigt.

40 Die Verhältnisse der zugegebenen und aufgenommenen  $\gamma$ -Linolensäure sind durch fettgedruckte Zahlen hervorgehoben, die der elongierten Produkte durch rote Zahlen und die der elongierten  $\gamma$ -Linolensäure durch fettgefruckte Zahlen (letzte Zeile).

45

## 79

Die GC-Analyse von FAMES, die aus Gesamt-Lipiden der mit pYES2 (i/Kontrolle) und pY2PSE1 transformierten Hefen ist in Figur 1 gezeigt. Für die Analyse wurden die transgenen Hefen in Anwesenheit von  $\gamma$ -18:3 gezüchtet..

5

Die Ergebnisse zeigen, dass  $\gamma$ -18:3 in großen Mengen in alle transgenen Hefen eingebaut worden ist. Alle vier transgenen Hefeklone, die mit pY2PSE1 transformiert wurden, zeigen einen zusätzlichen Peak im Gaschromatogramm, der durch Vergleich der Retentionszeiten als 20:3<sup>Δ8,11,14</sup> identifiziert wurde. Eine Gaschromatographie/Massenspektroskopie kann zusätzliche Unterstützung zur Bestätigung dieser Identität liefern.

Die identifizierten Produkte zeigten, dass die Nukleotidsequenz von PiPSE1 eine  $\Delta^6$ -selektive Fettsäure-Elongase aus dem Moos *Physcomitrella patens* kodiert, die zur Bildung neuer Fettsäuren in transgenen Hefen führt.

Weitere Fütterungsexperimente mit verschiedenen anderen Fettsäuren (z.B. Linolsäure (18:2<sup>Δ9,12?</sup>), Stearidonsäure (18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup>)) können zur detaillierteren Bestätigung der Substratspezifität dieser Elongase durchgeführt werden.

Beispiel 14: Reinigung des gewünschten Produktes aus transformierten Organismen allgemein

Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus Pflanzenmaterial oder Pilzen, Algen, Ciliaten, tierischen Zellen oder aus dem Überstand der vorstehend beschriebenen Kulturen kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Wird das gewünschte Produkt nicht aus den Zellen sezerniert, können die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standardtechniken, wie mechanische Kraft oder Ultraschallbehandlung, lysiert werden. Organe von Pflanzen können mechanisch von anderem Gewebe oder anderen Organen getrennt werden. Nach der Homogenisation werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraktion, welche die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung der gewünschten Verbindung aufbewahrt. Wird das Produkt aus gewünschten Zellen sezerniert, werden die Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstandsfraktion wird zur weiteren Reinigung aufbewahrt.

Die Überstandsfraktion aus jedem Reinigungsverfahren wird einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Molekül entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird, viele Verunreinigungen in der Probe jedoch nicht,



oder die Verunreinigungen auf dem Harz zurückbleiben, die Probe hingegen nicht. Diese Chromatographieschritte können wenn nötig wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl geeigneter Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes zu reinigendes Molekül bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

10

Im Fachgebiet ist ein breites Spektrum an Reinigungsverfahren bekannt, und das vorstehende Reinigungsverfahren soll nicht beschränkend sein. Diese Reinigungsverfahren sind zum Beispiel beschrieben in Bailey, J.E., & Ollis, D.F., Biochemical

15 Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986).

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Standardtechniken des Fachgebiets bestimmt werden. Dazu gehören Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC),

20 spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologisch. Eine Übersicht über diese Analyseverfahren siehe in: Patek et al. (1994)

Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996)

Biotekhnologiya 11:27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess

25 Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical

Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A., et al. (1987) Applications of HPLC

30 in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

#### Äquivalente

35 Der Fachmann erkennt oder kann viele Äquivalente der hier beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen, indem er lediglich Routineexperimente verwendet. Diese Äquivalente sollen von den Patentansprüchen umfasst sein.

40

45

## Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäure, die für ein Polypeptid kodiert, das  
5 C<sub>16</sub>- oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen  
in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome  
verlängert, wobei die Fettsäuren C<sub>18:3</sub><sup>Δ5,9,12</sup>, C<sub>20:3</sub><sup>Δ8,11,14</sup>,  
C<sub>20:4</sub><sup>Δ5,8,11,14</sup> und C<sub>20:5</sub><sup>Δ5,8,11,14,17</sup> nicht verlängert werden.
- 10 2. Isolierte Nukleinsäure, umfassend eine Nukleotidsequenz,  
die ein Polypeptid kodiert, das C<sub>16</sub>- oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren  
mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül  
verlängert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus
  - 15 a) einer in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz,
  - b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich gemäß dem degenerier-  
ten genetischen Code von der in SEQ ID NO:2 dargestellten  
Sequenz ableitet,
  - 20 c) Derivate der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, die  
Polypeptide mit mindestens 50 % Homologie zu der Sequenz  
kodiert, die die Aminosäuresequenzen in SEQ ID NO:2  
kodiert, wobei die Sequenz als C<sub>16</sub>- oder C<sub>18</sub>-Elongase  
25 wirkt.
3. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 2, wobei die  
Sequenz von einem Oomyzet stammt.
- 30 4. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 2 oder  
Anspruch 3, wobei die Sequenz von der Gattung Phytophthora  
stammt.
5. Aminosäuresequenz, die von einer isolierten Nukleinsäure-  
35 sequenz nach einem der Ansprüche 2 bis 4 stammt.
6. Genkonstrukt, umfassend eine isolierte Nukleinsäure nach  
einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nukleinsäure funkti-  
onsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbun-  
40 den ist.
7. Genkonstrukt nach Anspruch 6, dessen Genexpression durch  
die Regulationssignale verstärkt wird.

## 82

8. Vektor, umfassend eine Nukleinsäure nach Anspruch 2 oder ein Genkonstrukt nach Anspruch 6.
9. Organismus, umfassend mindestens eine Nukleinsäure nach Anspruch 2, ein Genkonstrukt nach Anspruch 6 oder einen Vektor nach Anspruch 8.
10. Organismus nach Anspruch 9, wobei der Organismus ein Mikroorganismus, ein nicht-humanes Tier oder eine Pflanze ist.
11. Organismus nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Organismus eine transgene Pflanze ist.
12. Verfahren zur Herstellung von PUFAs, wobei das Verfahren das Züchten eines Organismus umfasst, der eine Nukleinsäure nach Anspruch 2, ein Genkonstrukt nach Anspruch 6 oder einen Vektor nach Anspruch 8 umfasst, kodierend ein Polypeptid, das C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül um mindestens zwei Kohlenstoffatome unter Bedingungen verlängert, unter denen PUFAs in dem Organismus gebildet werden.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die durch das Verfahren hergestellten PUFAs C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül sind.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremoleküle aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isoliert werden.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei der Organismus ein Mikroorganismus, ein Tier oder eine Pflanze ist.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei der Organismus eine transgene Pflanze ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei die C<sub>18</sub>-Fettsäure eine Fettsäure mit drei Doppelbindungen im Molekül ist.
18. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 17.

## 83

19. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfasst und von transgenen Pflanzen stammt.

5 20. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung nach Anspruch 19, wobei die PUFAs von transgenen Pflanzen stammen, welche eine Nukleotidsequenz nach Anspruch 2 umfassen.

10 21. Verwendung der Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

15

20

25

30

35

40

45

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Plant Science GmbH

<120> Neues Elongasegen und Verfahren zur Herstellung  
mehrfach ungesättigter Fettsäuren

&lt;130&gt; 925\_2001

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1066

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phytophthora infestans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (52)..(888)

&lt;400&gt; 1

```

gaattcggca cgaggttcgc acgtccatcg tctactcacc aacaagaagt c atg tcg 57
                                     Met Ser
                                     1

act gag cta ctg cag agc tac tac gcg tgg gcc aac gcc acg gag gcc 105
Thr Glu Leu Leu Gln Ser Tyr Tyr Ala Trp Ala Asn Ala Thr Glu Ala
      5                      10                      15

aag ctg ctg gac tgg gtc gac cct gag ggc ggc tgg aag gtg cat cct 153
Lys Leu Leu Asp Trp Val Asp Pro Glu Gly Gly Trp Lys Val His Pro
      20                      25                      30

atg gca gac tac ccc cta gcc aac ttc tcc agc gtc tac gcc atc tgc 201
Met Ala Asp Tyr Pro Leu Ala Asn Phe Ser Ser Val Tyr Ala Ile Cys
      35                      40                      45                      50

gtc gga tac ttg ctc ttc gta atc ttc ggc acg gcc ctg atg aaa atg 249
Val Gly Tyr Leu Leu Phe Val Ile Phe Gly Thr Ala Leu Met Lys Met
      55                      60                      65

gga gtc ccc gcc atc aag acc agt cca tta cag ttt gtg tac aac ccc 297
Gly Val Pro Ala Ile Lys Thr Ser Pro Leu Gln Phe Val Tyr Asn Pro
      70                      75                      80

atc caa gtc att gcc tgc tct tat atg tgc gtg gag gcc gcc atc cag 345
Ile Gln Val Ile Ala Cys Ser Tyr Met Cys Val Glu Ala Ala Ile Gln
      85                      90                      95

gcc tac cgc aac ggc tac acc gcc gcc ccg tgc aac gcc ttt aag tcc 393
Ala Tyr Arg Asn Gly Tyr Thr Ala Ala Pro Cys Asn Ala Phe Lys Ser
      100                      105                      110

```

gac gac ccc gtc atg ggc aac gtt ctg tac ctc ttc tat ctc tcc aag 441  
 Asp Asp Pro Val Met Gly Asn Val Leu Tyr Leu Phe Tyr Leu Ser Lys  
 115 120 125 130

atg ctc gac ctg tgc gac aca gtc ttc att atc cta gga aag aag tgg 489  
 Met Leu Asp Leu Cys Asp Thr Val Phe Ile Ile Leu Gly Lys Lys Trp  
 135 140 145

aaa cag ctt tcc atc ttg cac gtg tac cac cac ctt acc gtg ctt ttc 537  
 Lys Gln Leu Ser Ile Leu His Val Tyr His His Leu Thr Val Leu Phe  
 150 155 160

gtc tac tat gtg acg ttc cgc gcc gct cag gac ggg gac tca tat gct 585  
 Val Tyr Tyr Val Thr Phe Arg Ala Ala Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Ala  
 165 170 175

acc atc gtg ctc aac ggc ttc gtg cac acc atc atg tac act tac tac 633  
 Thr Ile Val Leu Asn Gly Phe Val His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr  
 180 185 190

ttc gtc agc gcc cac acg cgc aac att tgg tgg aag aag tac ctc acg 681  
 Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn Ile Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr  
 195 200 205 210

cgc att cag ctt atc cag ttc gtg acc atg aac gtg cag ggc tac ctg 729  
 Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val Thr Met Asn Val Gln Gly Tyr Leu  
 215 220 225

acc tac tct cga cag tgc cca ggc atg cct cct aag gtg ccg ctc atg 777  
 Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly Met Pro Pro Lys Val Pro Leu Met  
 230 235 240

tac ctt gtg tac gtg cag tca ctc ttc tgg ctc ttc atg aat ttc tac 825  
 Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu Phe Trp Leu Phe Met Asn Phe Tyr  
 245 250 255

att cgc gcg tac gtg ttc ggc ccc aag aaa ccg gcc gtg gag gaa tcg 873  
 Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro Lys Lys Pro Ala Val Glu Glu Ser  
 260 265 270

aag aag aag ttg taa cggcgcttgt taaaaagtct aacctcgctg taacagctta 928  
 Lys Lys Lys Leu  
 275

aaacacacac acacacaacg ctttgtagag gaggtaagta gtggcaactc gtgtagaaat 988

gcagcatgcc catcaaatac atcccgtatg attcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1048

aaaaaaaaaa aactcgag 1066

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 278

&lt;212&gt; PRT

<213> *Phytophthora infestans*

&lt;400&gt; 2

Met Ser Thr Glu Leu Leu Gln Ser Tyr Tyr Ala Trp Ala Asn Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Lys Leu Leu Asp Trp Val Asp Pro Glu Gly Gly Trp Lys Val  
 20 25 30  
 His Pro Met Ala Asp Tyr Pro Leu Ala Asn Phe Ser Ser Val Tyr Ala  
 35 40 45  
 Ile Cys Val Gly Tyr Leu Leu Phe Val Ile Phe Gly Thr Ala Leu Met  
 50 55 60  
 Lys Met Gly Val Pro Ala Ile Lys Thr Ser Pro Leu Gln Phe Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Asn Pro Ile Gln Val Ile Ala Cys Ser Tyr Met Cys Val Glu Ala Ala  
 85 90 95  
 Ile Gln Ala Tyr Arg Asn Gly Tyr Thr Ala Ala Pro Cys Asn Ala Phe  
 100 105 110  
 Lys Ser Asp Asp Pro Val Met Gly Asn Val Leu Tyr Leu Phe Tyr Leu  
 115 120 125  
 Ser Lys Met Leu Asp Leu Cys Asp Thr Val Phe Ile Ile Leu Gly Lys  
 130 135 140  
 Lys Trp Lys Gln Leu Ser Ile Leu His Val Tyr His His Leu Thr Val  
 145 150 155 160  
 Leu Phe Val Tyr Tyr Val Thr Phe Arg Ala Ala Gln Asp Gly Asp Ser  
 165 170 175  
 Tyr Ala Thr Ile Val Leu Asn Gly Phe Val His Thr Ile Met Tyr Thr  
 180 185 190  
 Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn Ile Trp Trp Lys Lys Tyr  
 195 200 205  
 Leu Thr Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val Thr Met Asn Val Gln Gly  
 210 215 220  
 Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly Met Pro Pro Lys Val Pro  
 225 230 235 240  
 Leu Met Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu Phe Trp Leu Phe Met Asn  
 245 250 255  
 Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro Lys Lys Pro Ala Val Glu  
 260 265 270  
 Glu Ser Lys Lys Lys Leu  
 275

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. August 2003 (07.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2003/064638 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82,  
C12P 7/64, C12N 9/02, A61K 31/20, A23L 1/30, A23K  
1/00, C12N 1/00

(74) Anwalt: BIEBERBACH, Andreas; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/000221

(22) Internationales Anmeldedatum:  
13. Januar 2003 (13.01.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 03 713.2 30. Januar 2002 (30.01.2002) DE  
102 05 607.2 11. Februar 2002 (11.02.2002) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, 67056 Ludwigshafen (DE).

Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): LERCHL, Jens [DE/SE]; Onsjövägen 17, S-268 31 Svalöv (SE). HEINZ, Ernst [DE/DE]; Püttkampsweg 13, 22609 Hamburg (DE). ZANK, Thorsten [DE/DE]; Lorenzengasse 13, 22303 Hamburg (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 31. Dezember 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ELONGASE GENE AND METHOD FOR PRODUCING POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

(54) Bezeichnung: ELONGASE-GEN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG MEHRFACH UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to a novel elongase gene comprising the sequence SEQ ID NO:1 or the homologues, derivatives or analogues thereof, to a gene construct comprising said gene or the homologues, derivatives or analogues thereof, and to the use of the same. The invention also relates to vectors or organisms having an elongase gene comprising the sequence SEQ ID NO:1 or the homologues, derivatives or analogues thereof. The invention further relates to a method for producing polyunsaturated fatty acids and to a method for introducing DNA into organisms which produce large quantities of oils, especially oils having a high unsaturated fatty acid content. Disclosed is also an oil and/or a fatty acid composition having a higher content of polyunsaturated fatty acids comprising at least two double bonds, and/or a triacylglycerine composition having a higher content of polyunsaturated fatty acids comprising at least two double bonds.

(57) Zusammenfassung: Diese Erfindung betrifft ein neues Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seine Homologa, Derivate oder Analoga, ein Genkonstrukt, das dieses Gen oder seine Homologa, Derivate oder Analoga umfasst, sowie seine Verwendung. Die Erfindung betrifft zudem Vektoren oder Organismen, die ein Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seine Homologa, Derivate oder Analoga umfassen. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren und ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Organismen, die grosse Mengen an Ölen und insbesondere Ölen mit hohem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren produzieren. Ausserdem betrifft die Erfindung ein Öl und/oder eine Fettsäure zusammensetzung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder eine Triacylglycerin-Zusammensetzung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen.

WO 2003/064638 A3



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/02221

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12P7/64 C12N9/02 A61K31/20 A23L1/30  
 A23K1/00 C12N1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N A61K A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Phytophthora infestans EST, 24 May 2003 (2003-05-24) retrieved from EBI Database accession no. cd257414 XP002247892 95,5% identity (98,313% ungapped) in 428nt overlap abstract	1
X	& KAMOUN, S. ET AL.: "Initial assessment of gene diversity for the oomycete pathogen Phytophthora infestans based on expressed sequences" FUNGAL GENET BIOL, vol. 28, no. 2, 1999, pages 94-106, Abstract	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 July 2003

Date of mailing of the international search report

04/08/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kronester-Frei, A

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Phytophthora infestans EST, 21 September 2001 (2001-09-21) retrieved from EBI Database accession no. be775687 XP002247893 94,725% identity (98,333% ungapped) in 436 nt overlap abstract	1
X	& KAMOUN S. ET AL.: "Initial assessment of gene diversity for the oomycete pathogen Phytophthora infestans based on expressed sequences" FUNGAL GENET BIO., vol. 28, no. 2, 1999, page 94-106	1
Y	WO 99 64616 A (ABBOTT LAB) 16 December 1999 (1999-12-16) examples; page 2, line 29	1-21
Y	WO 98 46765 A (THURMOND JENNIFER ;CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22 October 1998 (1998-10-22) cited in the application examples	1-21
A	CERTIK M ET AL: "Desaturase-defective fungal mutants: useful tools for the regulation and overproduction of polyunsaturated fatty acids" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 16, no. 12, 1 December 1998 (1998-12-01), pages 500-505, XP004143810 ISSN: 0167-7799 whole document, esp. Fig 2	1-21
P,Y	ABBADI A ET AL: "Transgenic oilseeds as sustainable source of nutritionally relevant C20 and C22 polyunsaturated fatty acids?" EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY, WILEY VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 103, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 106-113, XP002228744 ISSN: 1438-7697 whole document, esp. page 1 line 29, page 10	1-21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

**PCT/EP03/00221**

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**see supplemental sheet PCT/ISA/210**
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

☐  
☐

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box I.2

On account of the large number of claims and also the wording of the claims, which make it difficult if not impossible to determine the scope of protection sought, the application fails to meet the requirements of PCT Article 6 (see also PCT Rule 6.1(a)) to such an extent that it is not possible to carry out a meaningful search. The search was therefore directed to the parts of the claims that seem to be properly supported and disclosed, namely the parts relating to SEQ ID No. 1 and SEQ ID No. 2. The other claimed sequences, the derivatives of SEQ ID No. 1 specified in Claim 2 (c), and the polypeptides displaying at least 50% homology with the sequence, were only searched to the extent that the search covered family variabilities in a given amino acid position (Registry of CA).

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subject matter that has not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00221

Patent document cited in search report	Classification date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9964616	A	16-12-1999 AU 4564399 A	30-12-1999
		WO 9964616 A2	16-12-1999
WO 9846765	A	22-10-1998 US 5972664 A	26-10-1999
		AU 720677 B2	08-06-2000
		AU 7114798 A	11-11-1998
		AU 720725 B2	08-06-2000
		AU 7114898 A	11-11-1998
		BG 103796 A	31-05-2000
		BG 103798 A	31-05-2000
		BR 9808506 A	23-05-2000
		BR 9809083 A	01-08-2000
		CN 1253587 T	17-05-2000
		CN 1253588 T	17-05-2000
		EP 0996732 A1	03-05-2000
		EP 1007691 A1	14-06-2000
		HU 0001295 A2	28-07-2000
		JP 2001527395 T	25-12-2001
		JP 2001523092 T	20-11-2001
		NO 994924 A	30-11-1999
		NO 994926 A	30-11-1999
		NZ 337458 A	28-07-2000
		NZ 337459 A	28-07-2000
		PL 336067 A1	05-06-2000
		PL 336077 A1	05-06-2000
		SK 139799 A3	16-05-2000
		SK 139999 A3	16-05-2000
		TR 9902466 T2	21-07-2000
		TR 9902474 T2	21-02-2000
		WO 9846764 A1	22-10-1998
		WO 9846765 A1	22-10-1998
		US 2003104596 A1	05-06-2003
		US 6432684 B1	13-08-2002
		US 6589767 B1	08-07-2003
		US 6428990 B1	06-08-2002
		US 6051754 A	18-04-2000

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12P7/64 C12N9/02 A61K31/20 A23L1/30  
A23K1/00 C12N1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C12N A61K A01K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, EMBL

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! Phytophthora infestans EST, 24. Mai 2003 (2003-05-24) retrieved from EBI Database accession no. cd257414 XP002247892 95,5% identity (98,313% ungapped) in 428nt overlap Zusammenfassung & KAMOUN, S. ET AL.: "Initial assessment of gene diversity for the oomycete pathogen Phytophthora infestans based on expressed sequences" FUNGAL GENET BIOL. Bd. 28, Nr. 2, 1999, Seiten 94-106, Abstract	1
X	---	1
	-/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juli 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/08/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kronester-Frei, A

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE LITERATUREN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! Phytophthora infestans EST, 21. September 2001 (2001-09-21) retrieved from EBI Database accession no. be775687 XP002247893 94,725% identity (98,333% ungapped) in 436 nt overlap	1
X	Zusammenfassung & KAMOUN S. ET AL.: "Initial assessment of gene diversity for the oomycete pathogen Phytophthora infestans based on expressed sequences" FUNGAL GENET BIO., Bd. 28, Nr. 2, 1999, Seite 94-106	1
Y	WO 99 64616 A (ABBOTT LAB) 16. Dezember 1999 (1999-12-16) examples; page 2, line 29	1-21
Y	WO 98 46765 A (THURMOND JENNIFER ;CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) in der Anmeldung erwähnt examples	1-21
A	CERTIK M ET AL: "Desaturase-defective fungal mutants: useful tools for the regulation and overproduction of polyunsaturated fatty acids" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 16, Nr. 12, 1. Dezember 1998 (1998-12-01), Seiten 500-505, XP004143810 ISSN: 0167-7799 whole document, esp. Fig 2	1-21
P,Y	ABBADI A ET AL: "Transgenic oilseeds as sustainable source of nutritionally relevant C20 and C22 polyunsaturated fatty acids?" EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY, WILEY VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, Bd. 103, Nr. 2, Februar 2001 (2001-02), Seiten 106-113, XP002228744 ISSN: 1438-7697 whole document, esp. page 1 line 29, page 10	1-21

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. —  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. —  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
**siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
3. ☐ Ansprüche Nr. —  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: —

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.



WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## Fortsetzung von Feld I.2

Angesichts der großen Zahl wie auch des Wortlauts der geltenden Patentansprüche, welche es damit erschweren wenn nicht gar unmöglich machen, den durch sie erstrebten Schutzzumfang zu bestimmen, entspricht die vorliegende Patentanmeldung den Anforderungen des Artikels 6 PCT (vgl. auch Regel 6.1(a) PCT) in einem Maße nicht, daß eine sinnvolle Recherche undurchführbar ist. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Sequenzen SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2. Alle ebenfalls beanspruchten Sequenzen, die laut Anspruch 2 c) Derivate der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, die Polypeptide mit mindestens 50% Homologie zu der Sequenz umfassen, wurden von der Recherche nur insofern umfasst als nach Familienvariabilitäten innerhalb einer bestimmten Aminosäureposition recherchiert wurde (Registry of CA).

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/00221

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9964616	A	16-12-1999	AU 4564399 A 30-12-1999
		WO 9964616	A2 16-12-1999
WO 9846765	A	22-10-1998	US 5972664 A 26-10-1999
		AU 720677	B2 08-06-2000
		AU 7114798	A 11-11-1998
		AU 720725	B2 08-06-2000
		AU 7114898	A 11-11-1998
		BG 103796	A 31-05-2000
		BG 103798	A 31-05-2000
		BR 9808506	A 23-05-2000
		BR 9809083	A 01-08-2000
		CN 1253587	T 17-05-2000
		CN 1253588	T 17-05-2000
		EP 0996732	A1 03-05-2000
		EP 1007691	A1 14-06-2000
		HU 0001295	A2 28-07-2000
		JP 2001527395	T 25-12-2001
		JP 2001523092	T 20-11-2001
		NO 994924	A 30-11-1999
		NO 994926	A 30-11-1999
		NZ 337458	A 28-07-2000
		NZ 337459	A 28-07-2000
		PL 336067	A1 05-06-2000
		PL 336077	A1 05-06-2000
		SK 139799	A3 16-05-2000
		SK 139999	A3 16-05-2000
		TR 9902466	T2 21-07-2000
		TR 9902474	T2 21-02-2000
		WO 9846764	A1 22-10-1998
		WO 9846765	A1 22-10-1998
		US 2003104596	A1 05-06-2003
		US 6432684	B1 13-08-2002
		US 6589767	B1 08-07-2003
		US 6428990	B1 06-08-2002
		US 6051754	A 18-04-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**